

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN FARMACIA

SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI *SCAFFOLD* NANOFIBROSI A BASE DI POLIURETANO E CHITOSANO PER LA RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa Sandri Giuseppina

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Martina Betto
Matricola:506789

Anno Accademico 2025/2026

Sommario

1.1 Struttura e componenti cellulari..... 8

1.1.2 La matrice extracellulare..... 9

1.1.3 Organizzazione zonale e regionale..... 10

1.2 Funzioni biomeccaniche 12

1.3 Capacità rigenerativa 14

2.1 Cause Traumatiche e Degenerative..... 15

2.2 Osteoartrosi e difetti osteocondriali 17

2.3 Strategie terapeutiche attuali..... 19

2.3.1 Trattamenti conservativi..... 20

2.3.2 Interventi chirurgici..... 21

2.4 Medicina rigenerativa..... 22

2.4.1 Ingegneria tissutale..... 23

3.1 Requisiti biomimetici 28

3.2 Biomateriali per l'ingegneria tissutale della cartilagine..... 30

3.2.1 Biomateriali naturali..... 30

3.2.2 Biomateriali sintetici 35

4.1 Scopo del lavoro di tesi 40

4.2 Materiali..... 42

4.3 Produzione degli *scaffold*..... 43

4.3.1 Preparazione della soluzione polimerica..... 43

4.3.2 Produzione degli *scaffold* mediante elettrofilatura..... 43

4.3.3 Rivestimento degli *scaffold* con collagene..... 44

4.4 Caratterizzazione degli *scaffold*..... 45

4.4.1 Analisi morfologica e dimensionale..... 45

4.4.2 Proprietà meccaniche 46

4.4.3 Quantificazione del collagene adsorbito 47

4.4.4 Caratterizzazione chimica 48
4.4.5 Analisi topografica 48
4.4.6 Proprietà viscoelastiche 49
4.4.7 Bagnabilità delle superfici 50
4.4.8 Degradazione *in vitro* 51
4.4.9 Proprietà antiossidanti 52
4.4.10 Citotossicità *in vitro* 53
4.5 Analisi statistica 54
4.6 Risultati 54
4.6.1 Analisi morfologica e dimensionale degli *scaffold* non rivestiti di collagene 54
4.6.2 Proprietà meccaniche degli scaffold non rivestiti di collagene 56
4.6.3 Analisi morfologica e dimensionale degli *scaffold* rivestiti di collagene 58
4.6.4 Quantificazione del collagene adsorbito 58
4.6.5 Caratterizzazione chimica 59
4.6.6 Proprietà meccaniche degli *scaffold* rivestiti di collagene 62
4.6.7 Analisi topografica 64
4.6.6 Proprietà viscoelastiche 65
4.6.7 Bagnabilità delle superfici 68
4.6.8 Degradazione *in vitro* 69
4.6.9 Proprietà antiossidanti 74
4.6.10 Citotossicità *in vitro* 75
4.7 Discussione 75
4.8 Conclusioni e prospettive future 78
Bibliografia 80

Introduzione

La cartilagine articolare è un tessuto connettivo altamente specializzato che riveste le superfici ossee delle articolazioni diartrodiali e svolge un ruolo fondamentale nel garantire il corretto movimento articolare. La sua particolare organizzazione strutturale e la composizione della matrice extracellulare le conferiscono proprietà biomeccaniche peculiari, consentendole di sostenere e distribuire i carichi meccanici e, al contempo, di assicurare un movimento delle superfici articolari caratterizzato da un ridotto coefficiente di attrito [1], [2], [3]. Tuttavia, l'assenza di vascolarizzazione e la limitata capacità proliferativa dei condrociti rendono questo tessuto caratterizzato da un potenziale rigenerativo intrinsecamente ridotto. Di conseguenza, in seguito a un danno traumatico o degenerativo, la cartilagine presenta una scarsa capacità di autoriparazione e il progressivo deterioramento della sua struttura può compromettere significativamente la funzionalità articolare [2], [4], [5].

Le lesioni cartilaginee rappresentano pertanto una problematica clinica rilevante e possono derivare sia da eventi traumatici acuti sia da processi degenerativi progressivi. Tra questi ultimi, l'osteoartrosi (OA) costituisce una delle principali patologie articolari ed è caratterizzata da alterazioni che coinvolgono non soltanto la cartilagine, ma l'intera articolazione, interessando anche la membrana sinoviale e l'osso subcondrale [12], [13], [15]. La progressiva degradazione della matrice extracellulare e l'alterazione dell'omeostasi dei condrociti determinano una compromissione delle proprietà strutturali e biomeccaniche del tessuto, con conseguente comparsa di dolore, rigidità e limitazione funzionale.

Le strategie terapeutiche attualmente disponibili comprendono trattamenti conservativi e differenti procedure chirurgiche, selezionate in funzione delle caratteristiche della lesione e delle condizioni del paziente. Sebbene tali approcci possano consentire il controllo della sintomatologia o favorire la riparazione del difetto, presentano ancora importanti limitazioni, soprattutto per quanto riguarda la possibilità di ottenere una rigenerazione completa della cartilagine ialina. Alcune tecniche riparative, infatti, possono determinare la formazione di tessuto prevalentemente fibrocartilagineo, caratterizzato da una composizione e da proprietà biomeccaniche inferiori rispetto a quelle del tessuto nativo [18], [23],

[24]. La necessità di superare tali limitazioni ha quindi favorito lo sviluppo di strategie innovative nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale.

In questo contesto, particolare interesse è rivolto alla progettazione di *scaffold* tridimensionali in grado di ricreare un microambiente favorevole ai processi di rigenerazione. Tali sistemi non svolgono esclusivamente una funzione di supporto strutturale, ma possono interagire con l'ambiente biologico, favorendo l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare, sostenendo la progressiva deposizione di nuova matrice extracellulare.

Tra le differenti tecniche impiegate per la produzione di *scaffold*, l'elettrofilatura rappresenta una strategia particolarmente interessante, poiché permette di ottenere strutture nanofibrose caratterizzate da elevato rapporto superficie/volume, porosità e proprietà morfologiche modulabili [29], [31]. La possibilità di realizzare fibre di dimensioni nanometriche consente inoltre di riprodurre alcune caratteristiche dell'architettura fibrillare della matrice extracellulare, rendendo tali sistemi promettenti applicazioni per l'ingegneria tissutale.

Parallelamente, la scelta dei biomateriali costituisce un elemento determinante nella progettazione dello *scaffold*. L'impiego di polimeri sintetici permette generalmente di ottenere adeguate proprietà meccaniche e un elevato controllo delle caratteristiche del costrutto, mentre i biomateriali di origine naturale possono conferire una maggiore biocompatibilità e favorire l'interazione con l'ambiente biologico. La combinazione di componenti sintetiche e naturali rappresenta quindi una strategia promettente per lo sviluppo di sistemi compositi multifunzionali, capaci di integrare in un unico *scaffold* proprietà strutturali, meccaniche e biologiche complementari [25], [28], [37].

Sulla base di tali considerazioni, il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito dello sviluppo di *scaffold* nanofibrosi compositi per la rigenerazione della cartilagine articolare, ottenuti mediante elettrofilatura. In particolare, è stata studiata la combinazione di poliuretano termoplastico (TPU), utilizzato come matrice polimerica strutturale, e l'oligosaccaride del chitosano (COS), introdotto al fine di conferire al sistema specifiche proprietà biologiche e superficiali. Le

membrane fibrose sono state sottoposte a rivestimento superficiale con collagene di tipo I, con lo scopo di rendere la superficie maggiormente favorevole all'interazione con l'ambiente biologico.

Il sistema ottenuto è stato quindi caratterizzato e valutato in relazione al suo possibile impiego nella realizzazione di *scaffold* nanofibrosi per la rigenerazione della cartilagine articolare.

Capitolo 1: Cartilagine articolare

La cartilagine è un tessuto connettivo specializzato che riveste le superfici terminali delle ossa nelle articolazioni diartrodiali. Appartenente alla categoria della cartilagine ialina, presenta uno spessore generalmente compreso tra 2 e 4 mm e una superficie liscia, altamente lubrificata, caratteristiche che favoriscono lo scorrimento reciproco delle superfici articolari e consentono di mantenere un coefficiente di attrito ridotto [1], [2], [3]. Dal punto di vista anatomico e funzionale, si distingue per l'assenza completa di vasi sanguigni, vasi linfatici e terminazioni nervose.

L'assenza di vascolarizzazione fa sì che l'apporto di ossigeno e nutrienti avvenga esclusivamente per diffusione del liquido sinoviale. Tale processo è favorito dall'alternanza di carico e scarico a cui il tessuto è sottoposto durante il movimento articolare, che determina variazioni locali della pressione e facilita lo scambio di sostanze all'interno della matrice [1], [2], [4]. Tale caratteristica pur contribuendo alle proprietà funzionali della cartilagine, ne limita significativamente la capacità di riparazione in seguito a un danno. La scarsa disponibilità di nutrienti e ossigeno, associata all'assenza di vascolarizzazione e alla limitata attività proliferativa dei condrociti, determina infatti un potenziale rigenerativo intrinsecamente ridotto. Di conseguenza, le lesioni cartilaginee presentano una capacità di autoriparazione limitata e possono evolvere verso alterazioni strutturali e funzionali progressive. Il mantenimento dell'integrità della cartilagine articolare rappresenta pertanto un elemento fondamentale per garantire la corretta funzionalità dell'articolazione e preservarne le proprietà biomeccaniche nel tempo [2], [5].

1.1 Struttura e componenti cellulari

La cartilagine articolare è costituita da una matrice extracellulare (ECM) altamente organizzata, nella quale sono immerse poche cellule specializzate denominate condrociti.

1.1.1 I Condrociti: le cellule funzionali della cartilagine

I condrociti rappresentano la principale popolazione cellulare residente nella cartilagine articolare e derivano dal differenziamento di cellule staminali mesenchimali. Pur occupando solo una piccola frazione del volume complessivo del tessuto, stimata intorno al 2%, svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi della cartilagine. Queste cellule sono infatti responsabili della sintesi e del continuo rimodellamento della matrice extracellulare, attraverso la produzione e il turnover delle principali componenti della matrice, tra cui collagene, proteoglicani e altre molecole della matrice [2], [3], [6], [7].

A causa dell'assenza di vascolarizzazione, condrociti sono caratterizzati da un metabolismo prevalentemente anaerobico e dipendono principalmente dalla diffusione delle sostanze nutritive attraverso la matrice extracellulare. Ogni condrocita è inoltre circondato da una matrice specifica, pericellulare, che ne costituisce il microambiente e ne limita la capacità migratoria.

La morfologia, la dimensione e la distribuzione dei condrociti variano in funzione della profondità e della zona della cartilagine: nella regione superficiale le cellule presentano generalmente una forma più piccola e appiattita e risultano orientate parallelamente alla superficie articolare. Procedendo verso gli strati più profondi, i condrociti assumono progressivamente una morfologia più tondeggiante e, nella zona radiale, tendono a disporsi secondo strutture colonnari orientate prevalentemente perpendicolarmente alla superficie articolare. Questa organizzazione zonale riflette la complessa struttura della cartilagine e il diverso ruolo funzionale svolto dai condrociti nei vari strati del tessuto [2], [4], [8].

1.1.2 La matrice extracellulare

La matrice extracellulare (ECM) costituisce la maggior parte del volume della cartilagine articolare ed è composta principalmente da acqua, fibre di collagene e proteoglicani, a cui si aggiungono, in quantità minori, glicoproteine e altre proteine non collageniche tra cui fibronectina, proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP-Cartilage Oligomeric Matrix Protein) e matriline [3], [4], [7], [9].

- Acqua – rappresenta la principale costituente della cartilagine articolare, costituendo circa il 65–80% del peso umido del tessuto. La sua concentrazione è maggiore negli strati superficiali e diminuisce progressivamente verso quelli profondi. Oltre a favorire il trasporto di nutrienti e metaboliti, l'acqua svolge un ruolo fondamentale nel determinare il comportamento biomeccanico della cartilagine, contribuendo alla sua capacità di sostenere i carichi compressivi e alle sue proprietà lubrificanti [4], [10].
- Collagene – costituisce una componente fondamentale della ECM e rappresenta circa il 60% del suo peso secco. Il collagene di tipo II è la forma predominante e costituisce circa il 90–95% del collagene presente nella cartilagine articolare. Le molecole di collagene II si organizzano in una complessa rete tridimensionale che conferisce resistenza alla trazione e stabilità strutturale. A questa rete contribuiscono anche altri tipi di collagene, tra cui l collagene di tipo IX e XI, che partecipano alla regolazione dell'organizzazione e della stabilità delle fibrille [4], [9].
- Proteoglicani – sono macromolecole costituite da una componente proteica alla quale sono associate numerose catene di glicosaminoglicani (GAG). L'aggrecano rappresenta il proteoglicano predominante. L'aggrecano interagisce con l'acido ialuronico formando grandi aggregati macromolecolari in grado di trattenere elevate quantità di acqua all'interno della ECM. Questa proprietà è strettamente legata alla presenza delle cariche elettriche negative dei GAG, che favoriscono il richiamo e la ritenzione di acqua e contribuiscono alla capacità della cartilagine di resistere alle sollecitazioni compressive [4].

1.1.3 Organizzazione zonale e regionale

La cartilagine articolare presenta una struttura organizzata in quattro differenti zone, ciascuna caratterizzata da specifiche proprietà morfologiche, biochimiche e funzionali: (Figura 1) [3], [4], [7], [9], [10].

- **Zona superficiale** o tangenziale – rappresenta circa il 10–20% dello spessore totale. In questa regione le fibre di collagene sono disposte

parallelamente alla superficie articolare per contrastare le forze di taglio, mentre i condrociti hanno una forma appiattita [1], [2], [4].

- **Zona intermedia**, detta anche di transizione – costituisce il 40–60% del volume cartilagineo. Le fibre di collagene assumono un orientamento obliquo e i condrociti presentano una forma sferica con densità inferiore rispetto agli strati superficiali. Questa zona svolge un ruolo importante nella distribuzione dei carichi compressivi [2], [4].
- **Zona profonda** o radiale – occupa circa il 30% dello spessore della cartilagine. Le fibre di collagene sono orientate perpendicolarmente alla superficie articolare, garantendo una maggiore resistenza alla compressione. I condrociti risultano disposti in colonne parallele tra loro [1], [2].
- **Zona calcificata** – costituisce il passaggio tra la cartilagine ialina e l'osso subcondrale ed è delimitata dalla cosiddetta tidemark (sottile linea basofila che segna il passaggio dalla cartilagine calcificata a quella non calcificata). La sua funzione principale consiste nell'ancorare saldamente le fibre di collagene della zona profonda all'osso sottostante, assicurando la stabilità dell'interfaccia osteocartilaginea [9], [10].

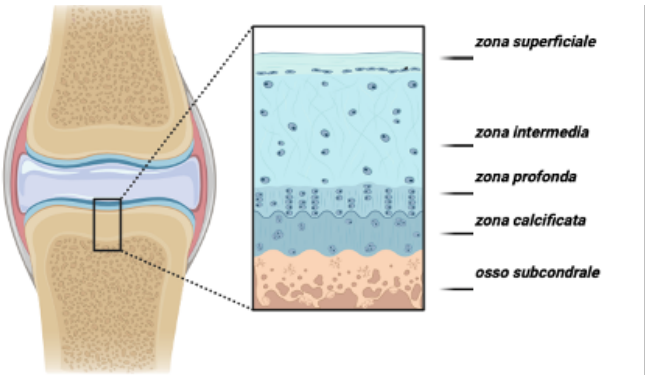


Figura 1. Organizzazione zonale della cartilagine articolare (creato con BioRender®).

Oltre alla suddivisione in base alla profondità del tessuto, la matrice extracellulare può essere distinta in differenti regioni in funzione della loro distanza dal condrocita. La matrice pericellulare è la regione immediatamente adiacente alla membrana cellulare e costituisce il microambiente più prossimo al condrocita ed è particolarmente ricca di proteoglicani. La matrice territoriale circonda la matrice pericellulare e presenta una rete di fibre di

collagene che contribuisce al supporto strutturale e alla protezione del condrocita. Infine, la matrice interterritoriale rappresenta la porzione quantitativamente più estesa della ECM e contiene la maggior parte della rete fibrillare di collagene e dei proteoglicani. La sua organizzazione contribuisce in maniera determinante alle proprietà meccaniche complessive della cartilagine articolare [5], [10].

1.2 Funzioni biomeccaniche

Le proprietà biomeccaniche della cartilagine articolare derivano dalla sua complessa organizzazione strutturale e dalla stretta interazione tra la ECM e i fluidi interstiziali. Grazie a questa particolare composizione, la cartilagine è in grado di sostenere e distribuire efficacemente i carichi meccanici a cui l'articolazione è sottoposta durante le attività quotidiane e i movimenti ripetuti. Il suo comportamento è caratterizzato da proprietà viscoelastiche e poroelastiche, che determinano una risposta dipendente dal tempo alle sollecitazioni applicate [9].

Per descrivere il comportamento meccanico della cartilagine articolare viene comunemente adottato un modello bifasico, nel quale il tessuto è considerato costituito da una fase fluida e una fase solida:

- **Fase fluida** – è composta principalmente da acqua, che può rappresentare fino all'80% del peso umido del tessuto, e da ioni presenti nel liquido interstiziale, tra cui sodio, calcio, cloruro e potassio [9], [10].
- **Fase solida** – è costituita dalla ECM, caratterizzata da una struttura porosa e permeabile composta principalmente da una rete fibrillare di collagene e da proteoglicani [1], [9].

Questa organizzazione è alla base della capacità della cartilagine di resistere alle sollecitazioni compressive. In condizioni di carico, infatti, una parte significativa del carico applicato viene sostenuta dalla pressione generata all'interno del fluido interstiziale. L'elevata capacità della matrice di trattenere acqua, determinata principalmente dalla presenza dei proteoglicani, contribuisce a mantenere tale pressione e a limitare la deformazione del tessuto [9], [10]. Quando viene applicato un carico, la pressione del fluido interstiziale aumenta

rapidamente. La bassa permeabilità della matrice limita la fuoriuscita dell'acqua e permette al fluido di sostenere una parte rilevante del carico applicato. Con il progressivo movimento del fluido attraverso la matrice, la risposta meccanica del tessuto evolve nel tempo fino al raggiungimento di una condizione di equilibrio [4], [9].

La dipendenza temporale della risposta meccanica può essere descritta attraverso fenomeni quali lo scorrimento viscoso (*creep*) e il rilassamento dello sforzo (*stress relaxation*). Nel primo caso, sottoponendo la cartilagine a uno sforzo compressivo costante, la deformazione aumenta progressivamente nel tempo fino a raggiungere una condizione di equilibrio [5], [9]. Nel rilassamento dello sforzo, invece, il tessuto viene portato rapidamente a una determinata deformazione e mantenuto in tale condizione: lo sforzo necessario a mantenerla diminuisce progressivamente nel tempo fino al raggiungimento dell'equilibrio [1], [9]. Questi fenomeni dipendono principalmente dal movimento del fluido attraverso la matrice, ma possono essere influenzati anche da meccanismi intrinseci associati alla riorganizzazione delle macromolecole della ECM.

Oltre alla resistenza alla compressione, la cartilagine deve essere in grado di sopportare sollecitazioni di trazione e di taglio. In questo contesto, la rete fibrillare di collagene svolge un ruolo fondamentale nel garantire l'integrità strutturale del tessuto e nel contrastare le deformazioni associate alle sollecitazioni tensile. Queste proprietà dipendono dalla disposizione delle fibrille, dalla loro organizzazione tridimensionale e dalla presenza di legami crociati che ne aumentano la stabilità [1], [9]. La particolare organizzazione delle fibre varia, inoltre, in funzione della profondità della cartilagine, contribuendo alla risposta anisotropa e non uniforme del tessuto alle diverse tipologie di carico [9].

Le proprietà biomeccaniche della cartilagine non rimangono tuttavia invariate nel corso della vita. Con l'invecchiamento, si verificano modificazioni progressive dell'omeostasi della ECM, tra cui alterazioni della composizione, dell'organizzazione delle fibre e del contenuto idrico. La riduzione dell'idratazione e le modificazioni della matrice possono determinare variazioni della risposta meccanica del tessuto, compromettendone progressivamente la

capacità di distribuire i carichi [4]. Tali alterazioni possono aumentare le sollecitazioni trasmesse alle strutture articolari sottostanti e contribuire, nel contesto di processi degenerativi, a modificazioni dell'osso subcondrale quali la sclerosi [1], [4].

1.3 Capacità rigenerativa

La capacità rigenerativa della cartilagine articolare è estremamente limitata ed è determinata dalla combinazione di caratteristiche biologiche e strutturali intrinseche del tessuto, rappresentando una delle principali sfide nel campo della medicina ortopedica [4], [9].

L'assenza di vascolarizzazione, insieme alla limitata capacità proliferativa dei condrociti e alla loro scarsa mobilità all'interno della ECM, ostacola i processi spontanei di riparazione. In particolare, la mancanza di una rete vascolare limita il reclutamento di cellule e mediatori coinvolti nei processi riparativi e fa sì che i condrociti dipendano dalla diffusione di nutrienti e ossigeno attraverso il liquido sinoviale e la ECM [4], [10]. La conseguente ridotta disponibilità di risorse metaboliche, associata alla bassa capacità proliferativa dei condrociti, rende difficile la sostituzione delle cellule e dei componenti della matrice persi in seguito a traumi o processi degenerativi [4], [8], [10].

A ciò si aggiunge la complessa organizzazione della ECM, caratterizzata da una precisa architettura tridimensionale e da una distribuzione zonale delle sue componenti. In seguito a una lesione, la ricostituzione spontanea di questa organizzazione risulta pertanto fortemente limitata. I processi di riparazione possono inoltre portare alla formazione di fibrocartilagine, caratterizzata da una composizione e da proprietà biomeccaniche differenti rispetto alla cartilagine ialina nativa, con una maggiore presenza di collagene di tipo I [8], [9], [10].

Capitolo 2: Patologie e lesioni della cartilagine

2.1 Cause Traumatiche e Degenerative

L'integrità della cartilagine può essere compromessa sia da eventi traumatici acuti sia da un progressivo deterioramento degenerativo. Le lesioni traumatiche possono derivare da traumi contusivi diretti, carichi d'impatto indiretti o forze torsionali [11]. Quando un carico meccanico viene applicato alla cartilagine in modo improvviso e intenso, il fluido interstiziale non ha il tempo necessario per redistribuirsi all'interno della ECM. Di conseguenza, una maggiore frazione del carico viene trasferita alla componente solida del tessuto, sottoponendo la rete di collagene e proteoglicani a sollecitazioni elevate che possono danni strutturali fino alla rottura [11]. Si distinguono tre classi principali di danno traumatico:

- **Danno microscopico** ‑ comprende alterazioni della ECM e delle cellule senza un'evidente interruzione della superficie articolare. Può essere associato a edema osseo rilevabile tramite risonanza magnetica.
- **Fratture condrali** – sono caratterizzate da una distruzione meccanica limitata al tessuto cartilagineo, senza coinvolgimento dell'osso subcondrale.
- **Fratture osteocondrali** – sono lesioni che si estendono attraverso l'intero spessore della cartilagine fino a interessare l'osso subcondrale sottostante.

Il processo degenerativo è invece spesso associato a uno squilibrio tra le proprietà fisico-chimiche della cartilagine e le sollecitazioni meccaniche a cui il tessuto è sottoposto. A differenza normale invecchiamento, che comporta modificazioni biochimiche e strutturali senza necessariamente determinare una perdita di funzione, la degenerazione patologica è caratterizzata dalla progressiva alterazione della rete di collagene di tipo II e la deplezione di proteoglicani, in particolare di aggrecano [11], [12].

Fattori come allenamento errato degli arti, varismo o valgismo, instabilità legamentosa, obesità e applicazione di carichi ciclici superiori ai limiti

fisiologici possono contribuire all'alterazione dell'omeostasi dei condrociti e favorire processi catabolici all'interno della matrice. Ne conseguono fenomeni di fibrillazione della superficie cartilaginea e la formazione di fessurazioni, che possono progressivamente compromettere l'integrità del tessuto [11], [12], [13]. Indipendentemente dall'eziologia, traumatica o degenerativa, le lesioni della cartilagine articolare possono essere classificate secondo la classificazione di Outerbridge (Figura 2) [14], uno dei sistemi maggiormente utilizzati per la valutazione artroscopica della gravità del danno cartilagineo. La classificazione distingue quattro gradi progressivi sulla base della profondità e dell'estensione della lesione:

- **Grado I** – la cartilagine presenta un iniziale rammollimento (softening) e un rigonfiamento superficiale, senza una significativa perdita di tessuto. La superficie articolare rimane sostanzialmente integra e le alterazioni sono limitate agli strati più superficiali della cartilagine.
- **Grado II** – sono presenti fissurazioni o frammentazioni superficiali della cartilagine che interessano meno del 50% del suo spessore. La superficie articolare appare irregolare, ma il danno non raggiunge gli strati profondi e l'osso subcondrale rimane integro.
- **Grado III** – le fissurazioni diventano più profonde e interessano oltre il 50% dello spessore cartilagineo, senza tuttavia raggiungere ed esporre l'osso subcondrale. La cartilagine appare gravemente deteriorata, con aree di delaminazione e instabilità del tessuto residuo.
- **Grado IV** – rappresenta lo stadio più avanzato della lesione. È caratterizzato dalla perdita completa dello spessore della cartilagine, con conseguente esposizione dell'osso subcondrale. In questa fase, il rivestimento cartilagineo è assente nell'area lesionata, determinando un aumento dell'attrito articolare e compromettendo la funzionalità dell'articolazione, con un maggiore rischio di progressione verso l'artrosi [14].

Nel complesso, la classificazione di Outerbridge descrive la progressione del danno cartilagineo da alterazioni superficiali fino alla completa perdita dello spessore cartilagineo e all'esposizione dell'osso subcondrale. Essa costituisce

pertanto un utile riferimento per la descrizione standardizzata della gravità delle lesioni e per supportare la valutazione clinica e la pianificazione terapeutica [4], [9].

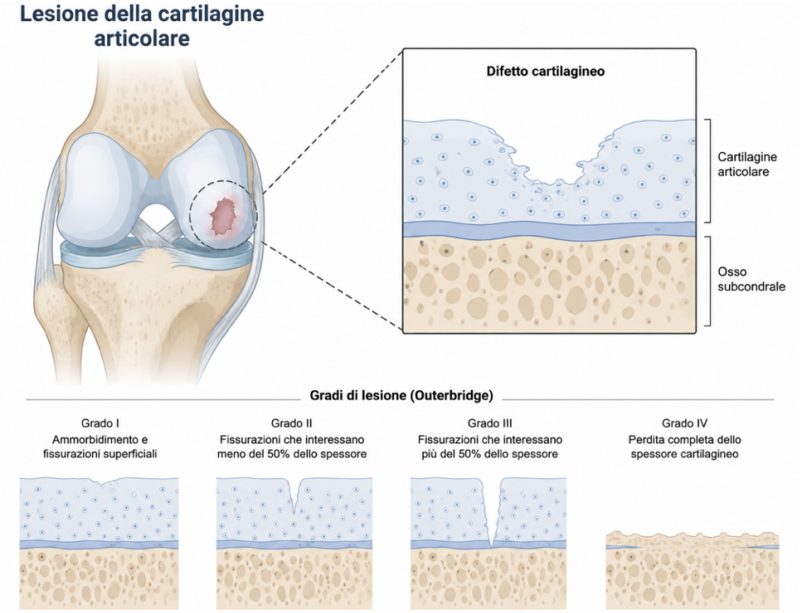


Figura 2. Gradi di lesione della cartilagine articolare secondo classificazione di Outerbridge (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

2.2 Osteoartrosi e difetti osteocondriali

L'osteoartrosi (OA) è attualmente definita come una sindrome complessa che coinvolge l'intera articolazione considerata come un'unica entità funzionale. Essa comprende processi degenerativi e infiammatori che coinvolgono diversi compartimenti articolari, tra cui la cartilagine articolare, la membrana sinoviale e l'osso subcondrale, determinando nel tempo una progressiva riduzione dello spazio articolare (Figura 3) [13], [15]. A livello molecolare, l'OA è caratterizzata da una cascata di eventi regolata anche da mediatori pro-infiammatori, tra cui principalmente l'interleuchina-1β (IL-1β) e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α) [15], [16]. Queste citochine stimolano i condrociti e altre cellule articolari a produrre enzimi proteolitici, tra cui le metalloproteinasi della matrice (MMP-1, MMP-3, MMP-13) e le aggrecanasi (ADAMTS-4 e ADAMTS-5), responsabili della degradazione di componenti fondamentali della ECM [12], [16]. Un aspetto fondamentale della patofisiologia dell'OA è rappresentato dall'alterazione del fenotipo dei condrociti [12], [16]. Nelle fasi iniziali della

malattia, le cellule tentano di compensare la perdita di ECM aumentando la sintesi di collagene e proteoglicani. Con la progressione della malattia, i condrociti possono andare incontro a modificazioni fenotipiche, assumendo caratteristiche ipertrofiche o perdendo il fenotipo caratteristico. Queste alterazioni possono determinare una produzione anomala delle componenti della matrice e contribuire alla progressiva compromissione delle proprietà strutturali e biomeccaniche della cartilagine. Nelle fasi più avanzate, il processo degenerativo può associarsi alla mineralizzazione della cartilagine e a modificazioni dell'osso subcondrale, tra cui il suo progressivo irrigidimento [12], [15].

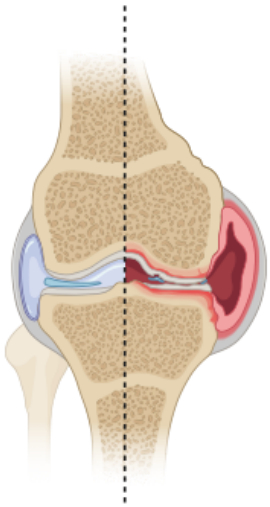


Figura 3. Confronto tra un'articolazione normale (sinistra) e un'articolazione affetta da osteoartrosi (destra). La zona evidenziata in rosso rappresenta i processi degenerativi e infiammatori (immagine creata con BioRender®).

2.2.1 Impatto clinico e socioeconomico

Dal punto di vista clinico, le alterazioni della cartilagine e delle altre strutture articolari associate all'OA possono manifestarsi con dolore, gonfiore, rigidità, limitazione del movimento e, negli stadi più avanzati, deformità articolare. Il dolore è spesso il sintomo predominante, sebbene la cartilagine sia priva di terminazioni nervose. La sintomatologia dolorosa deriva infatti principalmente dal coinvolgimento delle strutture circostanti innervate, tra cui la membrana sinoviale e l'osso subcondrale, che possono essere interessati dai processi infiammatori e degenerativi [13], [15], [16].

L’impatto socioeconomico dell’OA è rilevante e tende ad aumentare con l’invecchiamento della popolazione. Si stima che l’OA colpisca oltre il 25% della popolazione adulta e sia la causa principale di disabilità nei soggetti sopra i 40 anni. L’incremento dell’aspettativa di vita, la crescente prevalenza dell’obesità e l’incidenza di lesioni articolari associate all’attività sportiva rappresentano alcuni dei fattori che contribuiscono all’aumento del numero di persone affette dalla patologia. L’OA comporta quindi costi significativi per i sistemi sanitari, legati alla diagnosi, al trattamento farmacologico, agli interventi chirurgici e alla riabilitazione. L’assenza di trattamenti in grado di arrestare o modificare in maniera definitiva la progressione strutturale della malattia rappresenta pertanto una rilevante sfida clinica e socioeconomica [15], [16].

2.3 Strategie terapeutiche attuali

La gestione terapeutica delle lesioni cartilaginee e dell’OA si basa attualmente su un approccio multidisciplinare e personalizzato [17], [18], che tiene conto di numerosi fattori, tra cui l’età del paziente, il livello di attività fisica, la localizzazione e l’estensione della lesione, il grado di degenerazione articolare e gli eventuali fattori biomeccanici associati [17], [19], [20]. Come mostrato in Figura 4, le strategie terapeutiche possono essere suddivise principalmente in trattamenti conservativi, finalizzati alla riduzione della sintomatologia e al mantenimento della funzione articolare, e interventi chirurgici, volti alla riparazione o alla sostituzione del tessuto danneggiato nei casi in cui le terapie non invasive risultino insufficienti (Figura 4) [17], [20], [21].

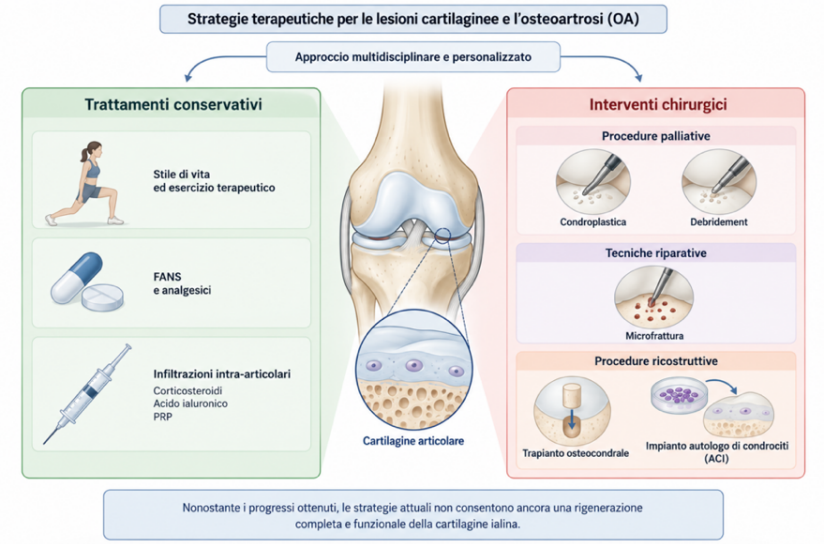


Figura 4. Rappresentazione schematica delle principali strategie terapeutiche per le lesioni cartilaginee e l'osteoartrosi (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

2.3.1 Trattamenti conservativi

Il trattamento conservativo rappresenta generalmente il primo approccio nel trattamento delle lesioni cartilaginee e nelle fasi iniziali dell'OA, soprattutto quando il danno strutturale non è esteso e la sintomatologia può essere controllata attraverso strategie non invasive. L'obiettivo principale di tali interventi è la riduzione del dolore, il miglioramento della mobilità articolare e il rallentamento della progressione della degenerazione cartilaginea [17], [22].

Tra le principali strategie conservative rientra la modificazione dello stile di vita, che comprende il controllo del peso corporeo, l'attività fisica adattata e programmi di esercizio terapeutico e fisioterapia [1], [17], [22].

Dal punto di vista farmacologico, vengono comunemente utilizzati farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e analgesici per il controllo del dolore associato alla patologia [17], [20], [22].

In alcuni casi possono essere impiegate infiltrazioni intra-articolari, tra cui corticosteroidi, acido ialuronico e, più recentemente, preparazioni contenenti fattori biologici come il plasma ricco di piastrine (PRP) [1], [17], [20]. Questi trattamenti possono fornire un beneficio sintomatico temporaneo attraverso la modulazione dell'infiammazione e, nel caso dell'acido ialuronico, il miglioramento delle proprietà lubrificanti del liquido sinoviale. Tuttavia, le

evidenze disponibili non dimostrano ancora in modo consolidato la capacità di tali trattamenti di arrestare o invertire il processo degenerativo della cartilagine [17].

2.3.2 Interventi chirurgici

Gli interventi chirurgici vengono generalmente considerati nei pazienti che non ottengono un miglioramento sufficiente mediante i trattamenti conservativi o nei casi caratterizzati da lesioni cartilaginee estese o profonde, oppure associate ad alterazioni strutturali dell'articolazione.

Le procedure disponibili possono essere classificate in tecniche palliative, riparative e ricostruttive, ciascuna caratterizzata da differenti indicazioni cliniche e risultati a lungo termine [18], [19], [21], [22].

Gli **interventi palliativi**, come la condroplastica e il debridement artroscopici**,** hanno l'obiettivo di rimuovere frammenti cartilaginei instabili e regolarizzare la superficie articolare, al fine di ridurre i fenomeni meccanici responsabili di dolore e limitazione funzionale. Sebbene possano determinare un miglioramento temporaneo dei sintomi, tali procedure non sono generalmente in grado di modificare la progressione della degenerazione articolare, soprattutto nei pazienti con OA avanzata [1], [18], [22].

Tra le **tecniche riparative** rientrano le procedure di stimolazione midollare, come la microfrattura, che prevede la perforazione della superficie subcondrale per favorire il rilascio di cellule progenitrici e fattori biologici del midollo osseo [17], [23]. Questo processo favorisce la formazione di un tessuto riparativo prevalentemente fibrocartilagineo, caratterizzato da proprietà biomeccaniche inferiori rispetto alla cartilagine ialina nativa [18], [23], [24].

Tali tecniche risultano maggiormente indicate per il trattamento di lesioni focali di piccole dimensioni, in particolare nei pazienti giovani e fisicamente attivi [17], [20], [21].

Le **procedure ricostruttive** comprendono invece tecniche più complesse finalizzate al ripristino della superficie articolare attraverso il trasferimento di tessuto osteocondrale oppure mediante l'impianto di condrociti autologhi precedentemente isolati ed espansi in laboratorio, secondo la procedura nota

come impianto autologo di condrociti (ACI) [1], [22]. Questi approcci possono offrire risultati favorevoli nel trattamento di lesioni cartilaginee focali ed estese, ma presentano limitazioni legate alla disponibilità del tessuto, alla complessità chirurgica e alla variabilità dei risultati clinici [19], [24].

Nonostante i progressi ottenuti, le strategie terapeutiche attualmente disponibili presentano ancora importanti limitazioni, in particolare per quanto riguarda la capacità di ottenere una rigenerazione completa e funzionale della cartilagine ialina. Questa necessità ha favorito lo sviluppo di nuovi approcci basati sull'ingegneria tissutale, finalizzati alla progettazione di sistemi biologici in grado di promuovere la formazione e l'organizzazione di nuovo tessuto cartilagineo [19], [23], [24].

2.4 Medicina rigenerativa

Le limitazioni delle strategie terapeutiche convenzionali hanno progressivamente orientato la ricerca verso lo sviluppo di approcci in grado non solo di riparare il difetto cartilagineo, ma di ricostruire un tessuto biologicamente e funzionalmente assimilabile a quello fisiologico. A differenza della semplice riparazione, che generalmente determina la formazione di un tessuto riparativo con caratteristiche inferiori rispetto a quelle della cartilagine nativa, la rigenerazione mira al ripristino della struttura, della composizione e delle proprietà biomeccaniche della cartilagine articolare [18], [25], [26], [27].

In questo contesto si inserisce la medicina rigenerativa, disciplina che integra conoscenze provenienti dalla biologia cellulare, dalla scienza dei biomateriali e dall'ingegneria biomedica per sviluppare strategie innovative finalizzate alla ricostruzione dei tessuti danneggiati. Tra queste l'ingegneria tissutale rappresenta uno degli approcci più promettenti per la rigenerazione della cartilagine articolare, in quanto consente di ricreare un microambiente tridimensionale favorevole all'adesione e alla proliferazione cellulare, alla sintesi della ECM e al progressivo recupero della funzionalità del tessuto [5], [27], [28].

2.4.1 Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale (*Tissue Engineering,* TE) rappresenta uno dei settori più innovativi della medicina rigenerativa e nasce con l'obiettivo di sviluppare sostituenti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare la funzione di tessuti e organi danneggiati [29].

Nel caso della cartilagine articolare, l'ingegneria tissutale rappresenta un'alternativa alle strategie terapeutiche convenzionali, poiché non si limita alla sostituzione del tessuto lesionato, ma mira a promuovere la formazione di cartilagine ialina caratterizzata da proprietà biologiche e biomeccaniche il più possibile simili a quelle del tessuto fisiologico [27], [28].

Il concetto di ingegneria tissutale è stato formalizzato agli inizi degli anni Novanta da Langer e Vacanti, che la definirono come l'applicazione dei principi dell'ingegneria e delle scienze biologiche allo sviluppo di sostituenti funzionali destinati alla rigenerazione dei tessuti [6], [25]. Da allora, l'evoluzione delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e dei biomateriali ha determinato un rapido sviluppo di questa disciplina, ampliandone le potenzialità applicative in numerosi ambiti della medicina, tra cui l'ortopedia, la chirurgia ricostruttiva e la medicina cardiovascolare [18].

L'approccio classico dell'ingegneria tissutale si fonda sull'interazione sinergica di tre elementi fondamentali, comunemente definiti come i "tre pilastri" della TE: le cellule, i biomateriali e i fattori bioattivi (Figura 5) [25]. La combinazione di questi componenti permette di ricreare un ambiente tridimensionale favorevole ai processi di adesione, proliferazione e differenziamento cellulare, sostenendo la formazione di nuovo tessuto [30].



Figura 5. Rappresentazione schematica dei principi dell'ingegneria tissutale applicata alla rigenerazione della cartilagine articolare (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

La **componente cellulare** costituisce il principale elemento biologico del processo rigenerativo. Nel caso della cartilagine articolare, le principali sorgenti cellulari sono rappresentate dai condrociti e dalle cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) [6], [28]. I condrociti, essendo le cellule fisiologicamente presenti nella cartilagine, sono naturalmente predisposti alla sintesi di collagene di tipo II e proteoglicani, componenti fondamentali della matrice cartilaginea [5], [28]. Tuttavia, il loro utilizzo è limitato dalla ridotta disponibilità di tessuto donatore e dalla tendenza al dedifferenziamento durante l'espansione in coltura, fenomeno che comporta una progressiva perdita del fenotipo condrogenico [24], [28].

Per questo motivo, negli ultimi anni grande attenzione è stata rivolta alle MSCs, ottenibili da differenti fonti, come midollo osseo, tessuto adiposo, membrana sinoviale e cordone ombelicale. Queste cellule presentano un'elevata capacità proliferativa e possono differenziare verso il fenotipo condrocitario quando opportunatamente stimolate, rappresentando una delle risorse più promettenti per la medicina rigenerativa [6], [28].

Il secondo elemento fondamentale è costituito dai **fattori bioattivi**, ossia molecole in grado di modulare il comportamento cellulare attraverso specifiche vie di segnalazione. Tra questi rivestono particolare importanza il *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β), le *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), *l'Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) e il *Fibroblast Growth Factor* (FGF), tutti coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare, nella sintesi della matrice cartilaginea e nel mantenimento del fenotipo cartilagineo [18]. La somministrazione controllata di tali molecole consente di modulare il microambiente cellulare e di fornire segnali biologici in grado di favorire la condrogenesi e la sintesi di ECM [29].

Il terzo pilastro dell'ingegneria tissutale è rappresentato dagli ***scaffold*** tridimensionali, biomateriali progettati per fornire un supporto temporaneo alle cellule durante il processo di rigenerazione [30].

Negli ultimi anni il concetto di ingegneria tissutale ha subito una significativa evoluzione, passando da un approccio prevalentemente sostitutivo a strategie sempre più orientate verso la medicina rigenerativa [29]. Se inizialmente l'obiettivo era la produzione *in vitro* di un tessuto da impiantare successivamente nel paziente, le strategie più moderne mirano invece a stimolare direttamente i meccanismi di autoriparazione dell'organismo. In questa prospettiva, lo *scaffold* non viene progettato esclusivamente come supporto strutturale, ma come un sistema dinamico in grado di interagire con le cellule dell'ospite, modulare il microambiente biologico e favorire la rigenerazione del tessuto direttamente *in vivo* [26], [27], [28], [30].

L'affermazione di tecnologie innovative, quali la stampa 3D, l'elettrofilatura e la manifattura additiva, ha ulteriormente ampliato le possibilità offerte dall'ingegneria tissutale (Figura 6). Queste metodologie consentono di progettare *scaffold* con geometrie altamente controllate, elevata riproducibilità e proprietà strutturali personalizzabili in funzione delle specifiche esigenze biologiche e meccaniche del tessuto da rigenerare. La possibilità di modulare parametri quali porosità, orientamento delle fibre, rigidità e distribuzione dei fattori bioattivi rappresenta oggi uno degli aspetti più promettenti per la realizzazione di sostituti cartilaginei sempre più efficaci [6], [24], [28], [29].



Figura 6. Principali tecniche di fabbricazione degli *scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale e rigenerazione della cartilagine (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

Capitolo 3: Il ruolo degli *scaffold* nella rigenerazione del tessuto cartilagineo

Gli *scaffold* svolgono un ruolo determinante nella rigenerazione cartilaginea, in quanto forniscono un supporto tridimensionale in grado di favorire l'organizzazione cellulare e la deposizione della nuova ECM, contribuendo al contempo a mantenere condizioni favorevoli allo sviluppo del tessuto neoformato [18], [25], [29]. La loro progettazione deve quindi tenere conto di molteplici aspetti, tra cui le caratteristiche biologiche, meccaniche, superficiali e architetturali, che nel loro insieme e influenzano la qualità del tessuto rigenerato e l'efficacia del processo rigenerativo [28], [29].

Nel tessuto cartilagineo fisiologico, la ECM non svolge esclusivamente una funzione strutturale, ma costituisce un ambiente dinamico attraverso il quale i condrociti ricevono e integrano segnali biochimici e biomeccanici [18], [30]. L'interazione tra recettori cellulari, proteine della matrice e stimoli meccanici contribuisce, infatti, al mantenimento dell'omeostasi tissutale, regolando l'equilibrio tra sintesi e degradazione della ECM [25].

Una delle principali funzioni dello *scaffold* consiste nel fornire alle cellule un ambiente tridimensionale che ne favorisca l'adesione, l'organizzazione e il mantenimento del fenotipo condrogenico. A differenza delle colture bidimensionali tradizionali, nelle quali i condrociti possono assumere una morfologia fibroblastica e perdere progressivamente alcune delle proprie caratteristiche fenotipiche, gli *scaffold* tridimensionali permettono di preservare una morfologia cellulare più simile a quella fisiologica. [5], [18], [25].

Lo *scaffold* svolge inoltre un'importante funzione di supporto meccanico durante le prime fasi della rigenerazione [5], [24], [29]. Fino alla formazione di un tessuto sufficientemente maturo, il biomateriale contribuisce infatti a distribuire le sollecitazioni meccaniche, limitando l'esposizione delle cellule ai potenziali stress compressivi e di taglio e contribuendo alla stabilità dell'area da trattare [25], [29]. Questa funzione assume particolare rilevanza nelle articolazioni sottoposte a elevati carichi meccanici, come il ginocchio, l'anca e la caviglia [24], [25].

Un ulteriore aspetto riguarda le interazioni tra la superficie del biomateriale e le cellule. Le caratteristiche superficiali del materiale, quali rugosità, carica superficiale, idrofilia e composizione chimica, possono influenzare l'adsorbimento delle proteine plasmatiche e il successivo riconoscimento cellulare attraverso specifici recettori di membrana, tra cui le integrine. Questi eventi, che si verificano nelle fasi iniziali successive all'impianto possono condizionare significativamente la sopravvivenza, la proliferazione e il differenziamento cellulare [24], [30]. La modulazione delle proprietà superficiali rappresenta quindi una strategia per favorire l'interazione con il tessuto ospite [5], [30].

Gli *scaffold* possono inoltre essere impiegati come sistemi di rilascio controllato (*drug delivery systems*) per veicolare localmente diverse molecole bioattive [6], [26]. L'incorporazione di fattori di crescita, citochine, peptidi bioattivi o nanoparticelle consente di possibile ottenere un rilascio graduale e localizzato delle molecole terapeutiche direttamente nel sito della lesione. Tra le molecole maggiormente studiate rientrano TGF-β, BMP e IGF-1, note per il loro coinvolgimento nella regolazione della differenziazione condrogenica e della sintesi della ECM [29].

Parallelamente, lo *scaffold* può essere progettato per contribuire alla modulazione del microambiente infiammatorio presente nel sito di lesione. In seguito a un danno cartilagineo, il rilascio di citochine pro-infiammatorie, enzimi degradativi e specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species,* ROS), può compromettere la vitalità cellulare e accelerare la degradazione della matrice. L'integrazione nello *scaffold* di componenti in grado di sequestrare mediatori infiammatori o veicolare molecole con attività antiossidante rappresenta pertanto una possibile strategia per creare condizioni più favorevoli alla rigenerazione [6], [25].

L'efficacia dello *scaffold* dipende in gran parte dalla sua architettura tridimensionale. Una struttura porosa e interconnessa favorisce la diffusione di ossigeno e nutrienti, l'eliminazione dei prodotti di scarto e la distribuzione delle cellule all'interno del sistema [30], [31].

Tra le diverse tecniche di fabbricazione, l'elettrofilatura ha assunto un ruolo di primo piano grazie alla possibilità di produrre strutture nanofibrose caratterizzate da un elevato rapporto superficie/volume, elevata porosità e orientamento controllabile delle fibre [29], [31]. Tali caratteristiche consentono di modulare la topografia del materiale e di riprodurre, almeno in parte, alcune delle caratteristiche dell'organizzazione fibrosa dell'ECM nativa, favorendo al contempo le interazioni tra cellule e substrato [5], [29].

3.1 Requisiti biomimetici

Il concetto di biomimetismo rappresenta uno dei principi fondamentali dell'ingegneria tissutale moderna. Esso si basa sull'idea che un biomateriale non debba limitarsi a riempire un difetto anatomico, ma debba piuttosto ricreare condizioni favorevoli alla formazione di nuovo tessuto funzionale [29], [31].

La ECM cartilaginea costituisce il principale riferimento per questo approccio, essendo caratterizzata da un sistema altamente organizzato composto principalmente da collagene di tipo II, proteoglicani, GAG e acqua. La distribuzione di questi componenti determina proprietà quali resistenza alla compressione, capacità di distribuire uniformemente i carichi articolari e basso coefficiente di attrito durante il movimento [24]. La matrice svolge inoltre un importante ruolo nella regolazione del comportamento cellulare, fornendo segnali che contribuiscono al mantenimento del fenotipo condrogenico e all'omeostasi del tessuto [24], [28].

Alla base della progettazione biomimetica vi sono quindi **biocompatibilità** e **bioattività** [30]. Il biomateriale deve integrarsi con i tessuti dell'ospite senza indurre citotossicità, risposte immunitarie o fenomeni infiammatori [25]. Al contempo, deve essere in grado di interagire con l'ambiente biologico e fornire segnali favorevoli alla rigenerazione[28]. A questo scopo, la funzionalizzazione della superficie e l'incorporazione di molecole bioattive, quali peptidi e fattori di crescita, possono essere utilizzate per modulare le interazioni cellula-materiale e favorire la produzione di componenti tipiche della ECM cartilaginea, tra cui collagene di tipo II e aggrecano [5].

Un secondo elemento fondamentale riguarda la compatibilità meccanica con il tessuto nativo. Lo *scaffold* deve possedere una stabilità sufficiente a sostenere le sollecitazioni presenti nell'ambiente articolare durante le fasi iniziali della rigenerazione, senza tuttavia ostacolare la progressiva sostituzione del biomateriale con il tessuto neoformato [5], [28], [31].

Anche la **microarchitettura** rappresenta un elemento centrale dell'approccio biomimetico. La presenza di pori interconnessi deve consentire un adeguato trasporto di nutrienti, ossigeno e metaboliti, favorendo al contempo la colonizzazione cellulare. Dimensione, geometria e distribuzione dei pori devono essere quindi definite in funzione delle caratteristiche del tessuto da rigenerare, poiché l'architettura dello *scaffold* può influenzare la distribuzione delle cellule e l'organizzazione della nuova ECM [30], [31], [32].

Un ulteriore requisito è rappresentato dalla **biodegradabilità controllata** [25], [31]. Lo *scaffold* dovrebbe progressivamente perdere la propria funzione nel tempo, lasciando gradualmente spazio al tessuto neoformato, che progressivamente acquisisce stabilità e proprietà meccaniche adeguate. La velocità di degradazione dovrebbe pertanto essere coordinata con i processi di deposizione della nuova ECM. Una degradazione eccessivamente rapida potrebbe determinare una perdita prematura del supporto meccanico e compromettere il rimodellamento tissutale mentre una degradazione troppo lenta potrebbe ostacolare la progressiva sostituzione del biomateriale con il tessuto rigenerato [5], [31].

Infine, le **proprietà superficiali** del biomateriale rivestono un ruolo determinante nel processo rigenerativo. L'idrofilia, in relazione alla capacità di modulare l'adsorbimento delle proteine e le successive interazioni con le cellule, può contribuire alla formazione di un'interfaccia favorevole tra biomateriale e ambiente biologico [25]. Un'adeguata interazione con il mezzo acquoso circostante può quindi sostenere la sopravvivenza cellulare e la deposizione della ECM [18], [24].

Alla luce della complessità del microambiente cartilagineo, la progettazione degli *scaffold* si è progressivamente orientata verso sistemi multifunzionali, nei quali materiali differenti vengono combinati per compensare i limiti dei singoli

componenti. L'integrazione di materiali caratterizzati da elevate prestazioni meccaniche con componenti maggiormente bioattive permette infatti di ottenere sistemi capaci di rispondere contemporaneamente alle esigenze strutturali, meccaniche e biologiche della rigenerazione [18], [28], [29].

3.2 Biomateriali per l'ingegneria tissutale della cartilagine

La scelta del biomateriale rappresenta uno degli aspetti più critici nella progettazione di *scaffold* destinati alla rigenerazione della cartilagine articolare [33]. Il materiale impiegato deve essere in grado di fornire un ambiente tridimensionale favorevole alla crescita cellulare e alla deposizione di nuova matrice extracellulare, combinando proprietà biologiche, strutturali e meccaniche adeguate [34]. Numerosi biomateriali sono stati studiati a questo scopo e possono essere principalmente classificati in due categorie: biomateriali naturali e biomateriali sintetici [25]. I biomateriali naturali presentano generalmente caratteristiche di bioattività e composizione più prossime alla ECM nativa, favorendo le interazioni con le cellule, mentre i biomateriali sintetici consentono generalmente un maggiore controllo sulle proprietà meccaniche, sulla lavorabilità e sulla cinetica di degradazione [35], [36]. Per questo motivo, negli ultimi anni, particolare interesse è stato rivolto allo sviluppo di *scaffold* compositi, ottenuti mediante la combinazione di materiali appartenenti alle due categorie, con l'obiettivo di integrare i vantaggi dei biomateriali naturali e sintetici e di ottenere proprietà più adatte alle esigenze della rigenerazione del tessuto [37].

3.2.1 Biomateriali naturali

I biomateriali naturali, derivati dalla ECM o da fonti naturali, sono ampiamente utilizzati nell'ingegneria tissutale grazie alla loro elevata biocompatibilità e per la presenza di segnali biochimici capaci di modulare il comportamento cellulare [33], [38].

Tra questi, il **collagene** rappresenta uno dei biomateriali di maggiore interesse. Nella cartilagine articolare, il collagene di tipo II costituisce la principale componente fibrosa della ECM, formando una rete fibrillare che contribuisce al

mantenimento dell'integrità strutturale e alle proprietà meccaniche del tessuto [38], [39], [40], [41]. Oltre al ruolo strutturale, il collagene partecipa alle interazioni tra cellule e matrice, e contribuisce alla regolazione di processi quali adesione e organizzazione cellulare [39], [40], [41].

Dal punto di vista strutturale, il collagene è una proteina fibrosa caratterizzata dalla presenza di tre catene polipeptidiche α, organizzate nella caratteristica conformazione a tripla elica [33]. Ciascuna catena è caratterizzata dalla ripetizione del motivo amminoacidico $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, nel quale la glicina (Gly) occupa ogni terza posizione, mentre le posizioni X e Y sono frequentemente occupate da prolina (Pro) e 4-idrossiprolina (Hyp), rispettivamente [33]. Le ridotte dimensioni della glicina consentono alle tre catene di disporsi in modo altamente compatto nella regione interna della tripla elica, mentre la presenza della prolina e idrossiprolina contribuisce a mantenere stabile tale conformazione [33]. La struttura è ulteriormente stabilizzata dalla formazione di legami a idrogeno tra le catene polipeptidiche (Figura 7).

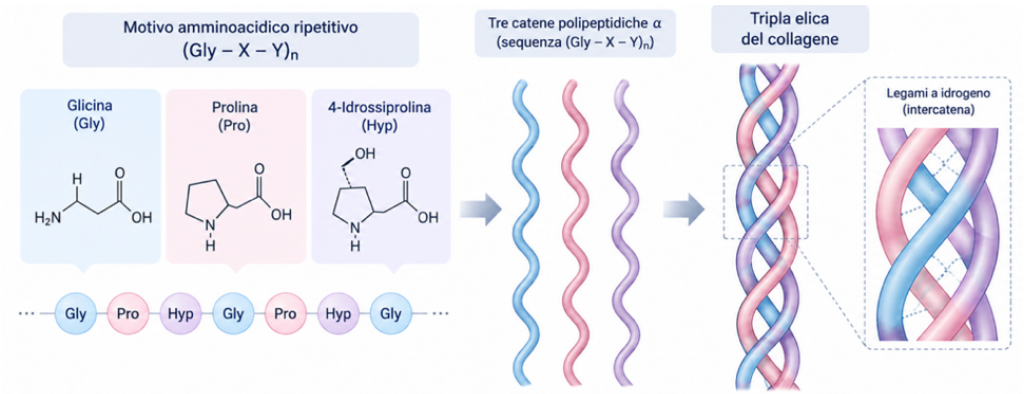


Figura 7. Rappresentazione schematica della struttura molecolare del collagene, caratterizzata dalla conformazione a tripla elica delle tre catene polipeptidiche α e dalla ripetizione del motivo $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

Gli *scaffold* a base di collagene presentano un'eccellente biocompatibilità e biodegradabilità e favoriscono l'interazione con le cellule attraverso specifiche sequenze peptidiche riconosciute delle integrine [33]. Queste caratteristiche rendono il collagene interessante non soltanto come componente strutturale dello *scaffold*, ma anche per la funzionalizzazione superficiale di sistemi sintetici o compositi. In particolare, il collagene di tipo I è frequentemente utilizzato come *coating* biologico per migliorare le caratteristiche della

superficie e favorire l'interazione con le cellule[39], [40], [42]. Il suo impiego in questo contesto non è finalizzato a riprodurre fedelmente la composizione della ECM cartilaginea, prevalentemente caratterizzata dalla presenza di collagene di tipo II, quanto piuttosto a conferire al biomateriale una maggiore bioattività superficiale.

Nonostante questi vantaggi, il collagene presenta una limitata resistenza meccanica e può degradarsi relativamente rapidamente, riducendo la stabilità dello *scaffold* nelle fasi iniziali della rigenerazione [25], [26]. Per questo motivo, viene frequentemente sottoposto a processi di reticolazione oppure combinato con polimeri sintetici, ottenendo sistemi in grado di combinare le sue proprietà biologiche ad una maggiore stabilità strutturale [33].

Un altro biomateriale largamente impiegato è il **chitosano**, un polisaccaride naturale ottenuto dalla deacetilazione della chitina, uno dei biopolimeri più abbondanti in natura, presente principalmente nell'esoscheletro dei crostacei e degli insetti e nelle pareti cellulari dei funghi [43], [44]. La sua struttura (Fig. 8) è costituita da unità di D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina e presenta analogie con i glicosaminoglicani (GAG), componenti fondamentali della ECM cartilaginea [25], [43], [45], [46]. La presenza di gruppi amminici primari lungo la catena polisaccaridica conferisce al chitosano una natura cationica, mentre il grado di deacetilazione (DD) e il peso molecolare (MW) ne condizionano proprietà quali solubilità, biodegradabilità, attività biologica e caratteristiche meccaniche [45], [46], [47], [48]. L'analogia strutturale con i GAG (Fig.8) e la capacità di interagire con l'ambiente biologico contribuiscono a rendere il chitosano particolarmente interessante per la rigenerazione cartilaginea. Esso presenta infatti una biocompatibilità e può sostenere l'adesione, la proliferazione e il differenziamento di diverse tipologie cellulari, tra cui condrociti e cellule staminali mesenchimali [43], [45], [46].

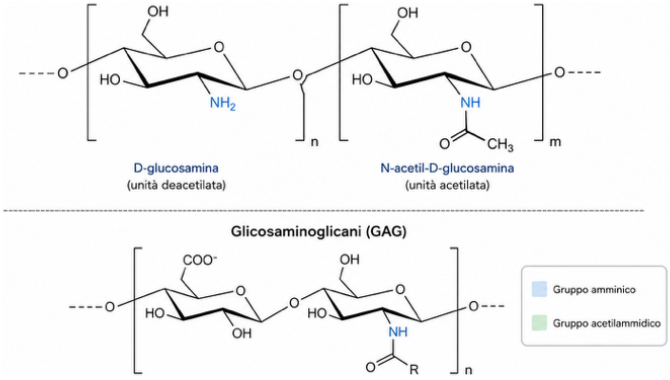


Figura 8. Struttura chimica del chitosano e analogia strutturale con i glicosaminoglicani (GAG) (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

Tra le proprietà biologiche di maggiore interesse del chitosano rientra inoltre la sua attività antimicrobica, nei confronti dei microrganismi sia Gram-positivi sia Gram-negativi (Figura 9). Tale attività è principalmente associata alla natura cationica del polimero: la protonazione dei gruppi amminici ($-NH_3^+$) favorisce l'interazione elettrostatica con le componenti anioniche della superficie microbica, alterandone l'integrità e la permeabilità [45], [46], [47], [48]. Per le catene a basso peso molecolare è stato inoltre proposto un ulteriore meccanismo, basato sulla possibilità di interazione con gli acidi nucleici e sulla conseguente interferenza con i processi di sintesi cellulare.

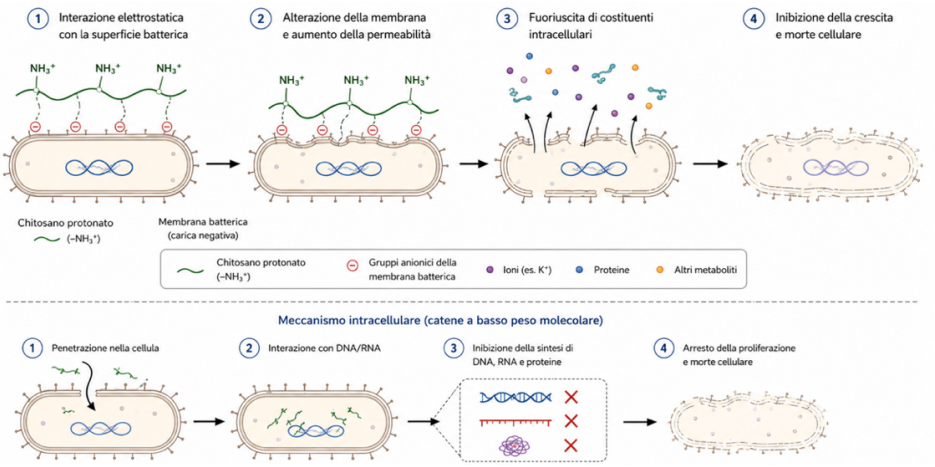


Figura 9. Rappresentazione schematica del meccanismo antibatterico del chitosano (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

Il chitosano viene principalmente degradato attraverso l'azione del lisozima, con formazione di prodotti a più basso peso molecolare che possono essere successivamente metabolizzati o eliminati. La velocità di degradazione dipende

da diversi parametri, tra cui grado di deacetilazione, peso molecolare e cristallinità [45], [46]. Nonostante la combinazione di proprietà biologiche e antimicrobiche, le limitate prestazioni meccaniche e la ridotta stabilità strutturale ne possono limitare l'impiego come unico componente dello *scaffold*. Per questo motivo, il chitosano viene frequentemente associato ad altri biomateriali, così da migliorarne le prestazioni complessive [46], [48].

L'**acido ialuronico** è un altro componente di particolare interesse, essendo naturalmente presente sia nella ECM cartilaginea sia nel liquido sinoviale [5]. Dal punto di vista strutturale, è un glicosaminoglicano (GAG) non solforato costituito dalla ripetizione di unità disaccaridiche formate da acido D-glucuronico (GlcA) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) (Figura 10) [5], [33] . La presenza di numerodi gruppi polari lungo la catena favorisce l'interazione con le molecole d'acqua mediante legami a idrogeno. Grazie alla sua elevata capacità di interagire con l'acqua, contribuisce al mantenimento dell'idratazione, della viscoelasticità e dell'omeostasi del tessuto, oltre a modulare numerosi processi cellulari attraverso il recettore CD44 [33].

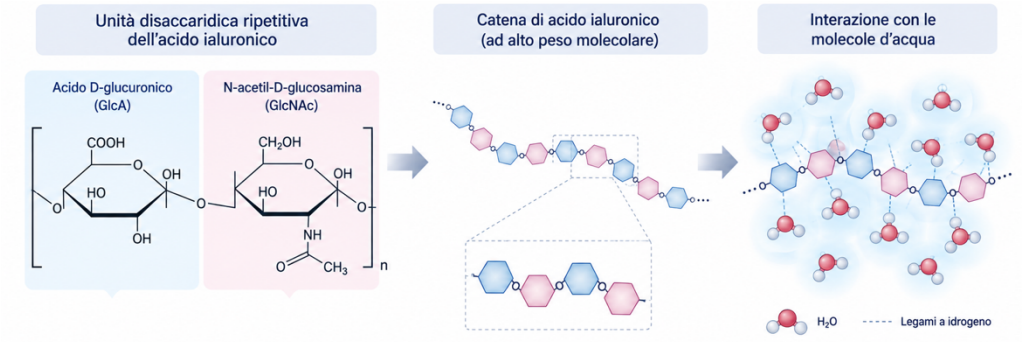


Figura 10. Rappresentazione schematica della struttura dell'acido ialuronico e della sua interazione con le molecole d'acqua (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

L'**alginato**, polisaccaride estratto dalle alghe brune, trova invece impiego nell'incapsulamento di condrociti e cellule staminali. Dal punto di vista strutturale, è un polisaccaride lineare costituito da unità di acido beta-D-mannuronico (M) e acido alfa-L-guluronico (G), organizzate in proporzioni e sequenze variabili lungo la catena polimerica (Figura 11). La sua principale peculiarità è la capacità di formare rapidamente idrogel attraverso la reticolazione ionica in presenza di ioni calcio, consentendo di creare un ambiente

acquoso e tridimensionale. Le proprietà meccaniche relativamente limitate ne rendono tuttavia frequente l'associazione con altri materiali, in particolare nei sistemi destinati a siti sottoposti a carico [21], [33].

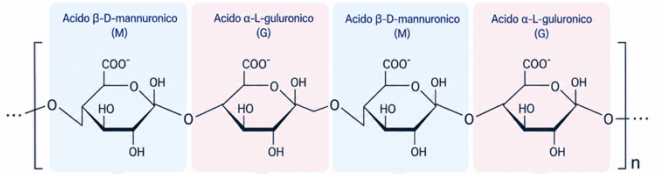


Figura 11. Struttura chimica dell'Alginato (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

Infine, la **fibroina della seta** si distingue per le buone proprietà meccaniche, l'elevata biocompatibilità e la possibilità di modulare la velocità di degradazione. Dal punto di vista strutturale, è una proteina fibrosa caratterizzata da sequenze amminoacidiche altamente ripetitive, ricche principalmente di glicina e alanina, con la presenza anche di serina, che favoriscono la formazione di strutture ordinate a foglietto ß (Figura 12). Tali caratteristiche la rendono particolarmente interessante come componente di rinforzo negli *scaffold* composti, nei quali può contribuire a migliorare la stabilità strutturale del costrutto mantenendo caratteristiche favorevoli all'interazione con le cellule [33]. Il suo impiego risulta pertanto particolarmente promettente nei sistemi destinati alla rigenerazione osteocondrale.

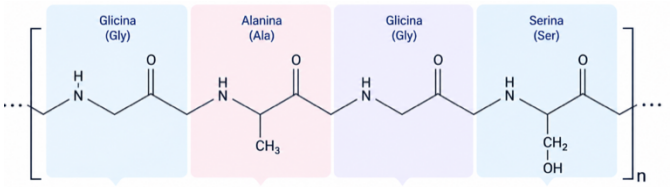


Figura 12. Struttura chimica della fibroina della seta (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

3.2.2 Biomateriali sintetici

I biomateriali sintetici costituiscono un'importante classe di materiali impiegati nella progettazione di *scaffold*. Rispetto ai biomateriali di origine naturale, la loro sintesi consente un controllo più preciso della composizione chimica, delle proprietà meccaniche e morfologiche, della velocità di degradazione e della lavorazione. Inoltre, la loro versatilità permette l'impiego di diverse tecniche di

fabbricazione, tra cui l'elettrofilatura, la stampa 3D e altri processi di manifattura additiva [33], [34].

Tra i polimeri sintetici di maggiore interesse rientrano i **poliuretani** (PU), caratterizzati da un'elevata versatilità progettuale. La possibilità di modulare la struttura macromolecolare consente, infatti, di ottenere materiali con proprietà differenti in funzione della specifica applicazione [49], [50], [51], [52]. I PU sono generalmente costituiti da copolimeri segmentati costituiti da un gruppo uretanico e dall'alternanza di segmenti rigidi (*hard segments*) e segmenti flessibili (*soft segments*), la cui diversa composizione e proporzione permette di controllarne rigidità, resistenza, elasticità e deformabilità (Figura 13).

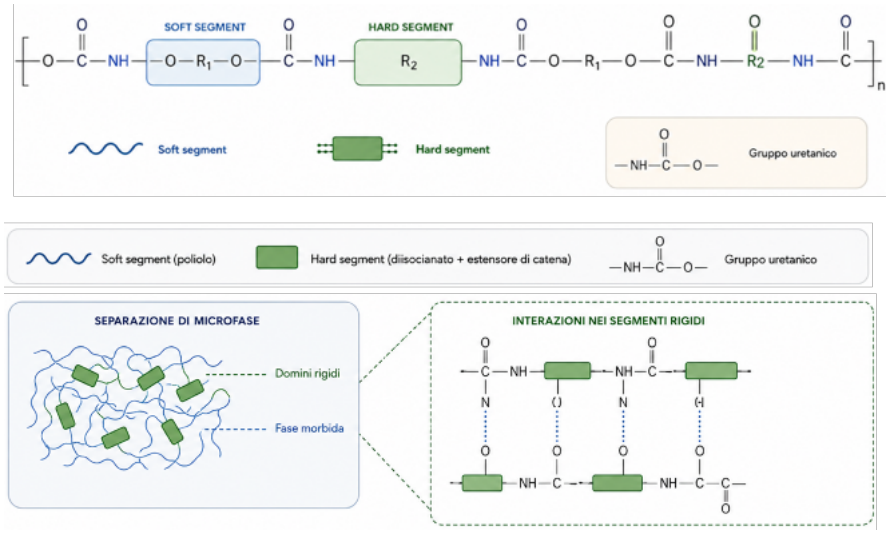


Figura 13. Rappresentazione schematica della struttura molecolare e schema della microstruttura di un poliuretano segmentato, costituito da segmenti rigidi e segmenti flessibili (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

I segmenti rigidi, costituiti principalmente da diisocianati e agenti estensori di catena, contribuiscono alla resistenza meccanica e alla stabilità strutturale, mentre i segmenti flessibili conferiscono maggiore elasticità e capacità deformativa [49], [50], [51], [52]. La possibilità di modificare la natura e il rapporto tra queste componenti permette di ottenere poliuretani con proprietà adattabili alla specifica applicazione.

Una caratteristica peculiare dei PU è la separazione microfasica, che determina la formazione di domini distinti su scala nanometrica, stabilizzati anche attraverso legami a idrogeno (Figura 13). L'organizzazione di queste regioni

influenza significativamente il comportamento meccanico, elastico e viscoelastico del materiale [50], [51]. Tali caratteristiche, associate a una buona resistenza alla fatica, rendono i PU particolarmente interessanti per applicazioni in cui lo *scaffold* deve mantenere le proprie prestazioni anche in presenza di sollecitazioni ripetute.

Dal punto di vista biologico, i PU possono presentare una buona biocompatibilità e stabilità; sebbene siano stati tradizionalmente progettati come materiali stabili, è possibile ottenere formulazioni biodegradabili introducendo nella struttura polimerica legami suscettibili a processi di idrolisi o degradazione enzimatica [49], [50], [51], [52].

Tra i poliesteri alifatici biodegradabili maggiormente studiati in ambito biomedico rientra l'**acido polilattico** (PLA), un polimero termoplastico ottenuto dalla polimerizzazione dell'acido lattico oppure, più comunemente, mediante polimerizzazione con apertura di anello (*ring-opening polymerization*) del lattide (Figura 14) [33]. La presenza di un centro chirale nell'acido lattico consente di ottenere diverse forme stereochimiche del PLA, tra cui il poli(L-lattide) (PLLA), poli(D-lattide) (PDLA) e il poli(D,L-lattide) (PDLLA) [33].

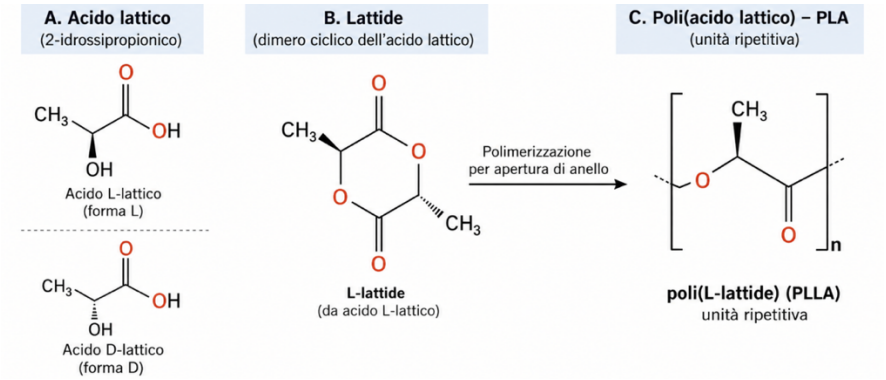


Figura 14. Struttura chimica del PLA/PLLA. (A) Enantiomero dell'acido lattico (B) Dimero ciclico dell'acido lattico (L-lattide) (C) unità ripetitiva del PLLA (immagine creata con ChatGPT, OpenAI).

Il PLA presenta buone proprietà meccaniche, tra cui un'elevata resistenza alla trazione e un elevato modulo elastico, caratteristiche che, associate alla sua biodegradabilità, ne hanno favorito l'impiego nella realizzazione di *scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale [33]. La degradazione avviene prevalentemente attraverso l'idrolisi dei legami estere presenti nella catena

polimerica, con progressiva riduzione del peso molecolare e formazione di prodotti a base di acido lattico, successivamente metabolizzabili dall'organismo [38]. La velocità di degradazione dipende da diversi fattori, tra cui peso molecolare, cristallinità, composizione stereochimica e caratteristiche strutturali del materiale [33]. La cinetica di degradazione rappresenta, pertanto, un parametro rilevante nella progettazione dello *scaffold*. In particolare, l'accumulo locale di prodotti di degradazione acidi può determinare una diminuzione del pH dell'ambiente circostante e favorire una risposta infiammatoria, rendendo necessario un adeguato controllo del processo degradativo [33], [38].

Un altro poliestere alifatico biodegradabile di particolare interesse è il **policaprolattone (PCL)**, un polimero termoplastico semicristallino ottenuto principalmente mediante polimerizzazione con apertura di anello dell'ε-caprolattone (Figura 15) [33] .

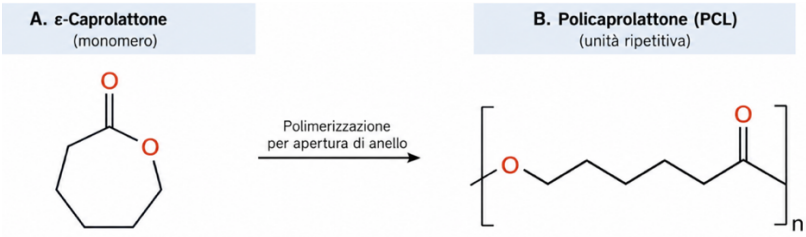


Figura 15. Struttura chimica del policaprolattone (PCL). (A) monomero ε-caprolattone (B) unità ripetitiva del PCL, ottenuto mediante polimerizzazione con apertura di anello (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

Rispetto al PLA, il PCL presenta una temperatura di fusione relativamente bassa, una maggiore flessibilità e una minore rigidità, caratteristiche che ne facilitano la lavorazione e permettono di ottenere strutture dotate di buona deformabilità. Una delle sue caratteristiche distintive è inoltre la lenta velocità di degradazione, principalmente attribuita alla natura semicristallina e idrofobica del polimero [33]. La degradazione avviene prevalentemente attraverso idrolisi dei legami estere della catena polimerica, ma procede generalmente più lentamente rispetto a quella di altri poliesteri biodegradabili, come il PLA.

La combinazione di flessibilità, stabilità e degradazione prolungata rende il PCL un materiale di interesse per la realizzazione di *scaffold* destinati all'ingegneria tissutale. Le sue proprietà possono inoltre essere modulate attraverso

l’associazione con altri polimeri sia naturali sia sintetici, consentendo di adattare le caratteristiche meccaniche, superficiali e biologiche alle specifiche esigenze applicative [33], [38].

Nel complesso, i polimeri sintetici offrono un elevato controllo sulle proprietà strutturali, meccaniche e degradative dello *scaffold*, oltre a una notevole versatilità nella progettazione e fabbricazione. Tecniche quali elettrofilatura, stampa 3D e altre metodologie di processamento consentono di ottenere architetture con caratteristiche morfologiche e dimensionali modulabili in funzione dell’applicazione [33], [37]. Inoltre, una cinetica di degradazione modulabile e, in alcune formulazioni, particolarmente prolungata può consentire allo *scaffold* di mantenere il proprio supporto strutturale per periodi compatibili con i tempi necessari alla formazione e alla maturazione di un tessuto stabile [37], [38]. D’altra parte, molti polimeri sintetici presentano una limitata bioattività, limitando le interazioni con proteine e cellule. L’idrofobicità delle superfici rappresenta uno dei fattori che possono contribuire a tale comportamento. Per questo motivo, vengono frequentemente adottate strategie di funzionalizzazione o di associazione con componenti biologicamente attivi, con l’obiettivo di migliorarne le caratteristiche biologiche [25], [37].

Capitolo 4: Attività sperimentale

4.1 Scopo del lavoro di tesi

La limitata capacità rigenerativa della cartilagine articolare e le criticità associate agli attuali approcci terapeutici hanno motivato lo sviluppo di strategie di ingegneria tissutale finalizzate alla realizzazione di nuovi sistemi biomimetici per la rigenerazione cartilaginea.

Sulla base di tali premesse, l'obiettivo principale del presente lavoro di tesi consiste nello sviluppo e nella caratterizzazione chimico-fisica, morfologica e meccanica di *scaffold* nanofibrosi multifunzionali, realizzati mediante la tecnica dell'elettrofilatura e destinati alla rigenerazione della cartilagine articolare.

Il sistema oggetto di studio è costituito dalla combinazione di tre biomateriali selezionati sulla base delle loro differenti caratteristiche: poliuretano termoplastico (TPU), oligosaccaride del chitosano (COS) e collagene insolubile di tipo I (COL). Il razionale alla base della progettazione dello *scaffold* è riassunto nella Tabella 1.

Tabella 1. Ruolo, principali caratteristiche e criticità dei biomateriali impiegati nella realizzazione degli *scaffold* compositi.

Componente	Ruolo nello *scaffold*	Principali caratteristiche	Criticità / Esigenza progettuale
TPU	Matrice strutturale	Elevata resistenza meccanica; elasticità e deformabilità; elevata resistenza alla fatica e ai carichi ciclici	Ridotta bagnabilità e interazione biologica
COS	Componente biofunzionale	Analogo ai GAG; proprietà antimicrobiche; capacità di modulare il microambiente	Elevata idrofilicità ed elevata interazione con l'ambiente acquoso
COL	Rivestimento superficiale bioattivo	Favorisce adesione, interazione cellulare e bioattività dello *scaffold*	Possibile disomogeneità del rivestimento superficiale

La combinazione dei tre componenti è stata progettata per associare caratteristiche complementari un unico sistema. In particolare, il TPU è stato utilizzato come matrice strutturale, mentre l'introduzione del COS è stata finalizzata a modificare le caratteristiche superficiali del sistema e a conferire proprietà di interesse biologico. Il rivestimento con collagene di tipo I è stato

eseguito successivamente, con l'obiettivo di modificare ulteriormente la superficie dello *scaffold* e favorire l'interazione dello *scaffold* con l'ambiente cellulare. Il suo impiego non è pertanto finalizzato a riprodurre fedelmente con la composizione della ECM cartilaginea, prevalentemente caratterizzata dal collagene di tipo II, ma a funzionalizzare la superficie dello *scaffold*.

Al fine di perseguire lo scopo generale del progetto, l'attività sperimentale è stata articolata in diverse fasi, finalizzate alla produzione, funzionalizzazione e caratterizzazione degli *scaffold* compositi.

La prima fase ha riguardato l'ottimizzazione del processo di elettrofilatura per la produzione delle membrane nanofibrose. A tale scopo sono state preparate miscele polimeriche a base di TPU contenenti concentrazioni crescenti di COS pari al 2, 8, 14 e 20 % in peso rispetto alla massa di TPU (w/w), ottenendo cinque differenti formulazioni: TPU puro, TPUCOS2, TPUCOS8, TPUCOS14 e TPUCOS20. Le formulazioni selezionate sono state successivamente sottoposte a coating biologico con collagene insolubile di tipo I, utilizzando una sospensione di collagene alla concentrazione di 3 $mg \cdot mL^{-1}$.

La caratterizzazione degli *scaffold* ha riguardato la valutazione delle proprietà morfologiche, chimiche, meccaniche e funzionali del sistema.

La morfologia e la topografia delle fibre sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e microscopia a forza atomica (AFM), prima e dopo il coating con collagene. La composizione chimica e le interazioni tra i diversi componenti del sistema sono state analizzate mediante spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR).

Le proprietà meccaniche sono state valutate sia a livello macroscopico, mediante dinamometro (Texture Analyser), sia a scala nanometrica, mediante microscopia a forza atomica associata a nanoindentazione, consentendo di caratterizzare le proprietà meccaniche anche a livello della singola fibra.

Il comportamento viscoelastico delle membrane è stato invece caratterizzato mediante analisi dinamico-meccanica (DMA) in condizioni idratate e a 37 °C.

La bagnabilità delle superfici è stata valutata mediante la misura dell'angolo di contatto a differenti intervalli temporali, mentre la stabilità degli *scaffold* è stata monitorata attraverso la variazione della massa e delle caratteristiche

morfologiche delle fibre dopo immersione in soluzione salina tamponata (PBS) con fosfati fino a 12 settimane a 37 °C.

Infine, sono state valutate le proprietà antiossidanti delle diverse formulazioni e la citotossicità preliminare *in vitro* degli estratti ottenuti dagli *scaffold*, utilizzando fibroblasti dermici umani (NHDFs) come linea cellulare di riferimento.

Tali valutazioni hanno fornito una prima indicazione sulle proprietà funzionali del sistema e sulla sua compatibilità biologica.

4.2 Materiali

Il poliuretano termoplastico (TPU, Lubrizol Pathway™ PY-83AE100) è stato acquistato da Lubrizol (Wickliffe, USA). L'oligosaccaride del chitosano (COS, Cat. No. 44009; peso molecolare determinato mediante GPC ≤ 5 kDa) è stato acquistato da Heppe Medical Company–Chitoceuticals. Il collagene bovino di tipo I, in forma di polvere fibrosa liofilizzata insolubile, estratto da tendine flessore bovino (Cat. No. 5162), è stato acquistato da Advanced BioMatrix, Inc., San Diego, CA, USA.

L'acido acetico glaciale (CAS No.: 64-19-7; ID: 302011) è stato acquistato da Carlo Erba Reagents, Francia. Il tampone fosfato salino (PBS) 1×, pH 7,4 (Cat. No. 46-013-CM) è stato acquistato da Corning (NY, USA). Il kit BCA (BCA1) e il DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile, MAK609) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germania). Il reagente AlamarBlue HS Cell Viability (A50101) è stato acquistato da Invitrogen, Thermo Fisher (Monza, Italia).

I fibroblasti dermici umani normali (NHDFs, PromoCell, C-12302), sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germania). Il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1×, 4,5 $g \cdot L^{-1}$ (Cat. No. 10-013-CMR), è stato acquistato da Corning (NY, USA).

4.3 Produzione degli *scaffold*

4.3.1 Preparazione della soluzione polimerica

Le soluzioni polimeriche destinate al processo di elettrofilatura sono state preparate solubilizzando il TPU e il COS in acido acetico glaciale, utilizzato come solvente monocomponente.

Per la formulazione di controllo, costituita da TPU puro, una quantità definita di polimero (12% w/w) è stata aggiunta all'acido acetico glaciale. La miscela è stata mantenuta sotto costante agitazione magnetica a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione del TPU, ottenendo una soluzione limpida, omogenea e priva di bolle d'aria.

Per la preparazione delle soluzioni composite contenenti COS a diverse concentrazioni, pari al 2%, 8%, 14% e 20% in peso rispetto al TPU, corrispondenti rispettivamente alle formulazioni TPUCOS2, TPUCOS8, TPUCOS14 e TPUCOS20, si è proceduto secondo quanto riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Composizione quali-quantitativa delle soluzioni polimeriche.

Formulazione	**Massa TPU**(%w/w)	**COS** (%w/TPU w)
TPU	12	-
TPUCOS2	12	2
TPUCOS8	12	8
TPUCOS14	12	1
TPUCOS20	12	20

4.3.2 Produzione degli *scaffold* mediante elettrofilatura

Le soluzioni sono state sottoposte a elettrofilatura mediante un sistema STKIT-40 (Linari Engeneering, Pisa, Italia) (Figura 16). L'apparecchiatura è costituita da un generatore di alta tensione (Razel R99-E 40 kV), operante nell'intervallo 5–40 kV, una siringa da 10 mL dotata di ago in acciaio inossidabile 21G, una pompa volumetrica (Razel R99-E) per il controllo della velocità di infusione della soluzione polimerica e un collettore statico in plexiglass rivestito con un foglio di alluminio.

Tutte le soluzioni sono state sottoposte elettrofilate mantenendo costanti principali parametri di processo: velocità di infusione pari a 0,397–0,596 $mL \cdot h^{-1}$, distanza ago–collettore di 20 cm e differenza di potenziale di 12 kV. Il processo

è stato condotto a temperatura ambiente (20–25°C), mantenendo l'umidità relativa (RH) dell'ambiente compresa tra il 25 e il 35%.

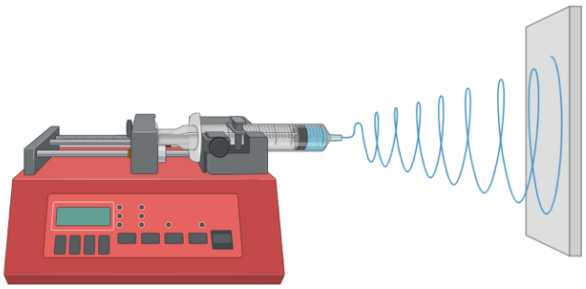


Figura 16. Sistema di elettrofilatura STKIT-40, Linari Engeneering (immagine creata con Biorender®).

4.3.3 Rivestimento degli *scaffold* con collagene

La sospensione è stata preparata utilizzando collagene bovino di tipo I alla concentrazione di 3 mg·mL^{-1} in HCl 0,01 M. La preparazione della sospensione e il successivo rivestimento degli *scaffold* sono stati effettuati secondo il seguente protocollo [53]:

1. **Preparazione della sospensione**:
   - idratazione della polvere di collagene in acqua purificata fredda per almeno 15 minuti sotto agitazione;
   - aggiunta di HCl 0,01 M e riposo per 10 minuti;
   - omogeneizzazione mediante Ultra-Turrax (T25 Easy Clean, IKA, Germania) per almeno 15 minuti, mantenendo la temperatura al di sotto di 24°C per evitare la denaturazione del collagene.
2. **Immersione**: gli *scaffold* in TPU, TPUCOS8 e TPUCOS20, di dimensioni 1 × 2 cm, sono stati immersi singolarmente in 1 mL di sospensione di collagene (3 mg·mL^{-1}) per 2 minuti.
3. **Lavaggio**: i campioni sono stati immersi in 1 mL di HCl 0,01 M per 10 secondi, per rimuovere il collagene debolmente adsorbito o depositato in modo aspecifico. Il lavaggio è stato ripetuto per due volte consecutive.
4. **Stabilizzazione**: i campioni sono stati immersi per pochi secondi in PBS 1×, al fine di stabilizzare il pH e favorire la strutturazione del collagene adsorbito.

5. **Asciugatura**: gli *scaffold* rivestiti, denominati TPUCOL, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL, sono stati lasciati asciugare all'aria a temperatura ambiente.

4.4 Caratterizzazione degli *scaffold*

4.4.1 Analisi morfologica e dimensionale

La morfologia superficiale degli *scaffold* nanofibrosi è stata analizzata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM, Phenom Pure Pro, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA) (Figura 17). Prima dell'analisi, i campioni sono stati sottoposti a metallizzazione mediante deposizione di un sottile strato d'oro (10 nm) (LUXOR Au, Luxor-Tec Gmbh, Svizzera), al fine di rendere elettricamente conduttiva la superficie degli *scaffold* e limitare l'accumulo di cariche elettrostatiche durante l'analisi SEM. Le immagini SEM degli *scaffold* sono state acquisite a tensioni di accelerazione pari a 10 e 15 kV, in condizioni di alto vuoto e a temperatura ambiente, utilizzando ingrandimenti di 1000×, 3600× e 6800×.



Figura 17. SEM Thermo Scientific Phenom Pure utilizzato per l'analisi morfologica delle membrane elettrofilate (immagine creata con Biorender®).

La determinazione del diametro delle fibre elettrofilate è stata effettuata mediante analisi digitale delle micrografie SEM, utilizzando il software ImageJ (ImageJ, ICY, Institut Pasteur, Parigi, Francia). Per ciascuna formulazione e per ciascuna condizione sperimentale. Per ciascuna formulazione, sono stati misurati casualmente 30 diametri di fibra**,** al fine di ottenere una valutazione rappresentativa della distribuzione dimensionale delle fibre.

4.4.2 Proprietà meccaniche

La caratterizzazione delle proprietà meccaniche delle nanofibre elettrofilate è stata effettuata mediante un Texture Analyzer (TA.XT plus, Stable Microsystems, Italia) (Figura 18), equipaggiato con un sistema di ancoraggio A/TG e una cella di carico da 5 kg. I campioni sono stati preparati in provini rettangolari di 2 × 1 cm, con una lunghezza utile di 1 cm. Lo spessore dei campioni è stato misurato mediante calibro elettronico (ORION 31170201) prima dell'esecuzione delle prove. Le prove di trazione fino a rottura sono state eseguite in condizioni a secco e umide, effettuando almeno tre repliche per ciascuna condizione sperimentale. I parametri sperimentali sono stati impostati come riportato in Tabella 3.

Tabella 3. Parametri sperimentali utilizzati per le prove di trazione mediante Texture Analyzer.

Parametro	Valore
Velocità di pre-test	0,5 $mm \cdot s^{-1}$
Velocità di test	0,5 $mm \cdot s^{-1}$
Velocità di post-test	5 $mm \cdot s^{-1}$
Forza di trigger	0,1 mN
Distanza	60 mm

I dati ottenuti sono stati elaborati per determinare la resistenza ultima a trazione, l'allungamento a rottura e il modulo di Young.

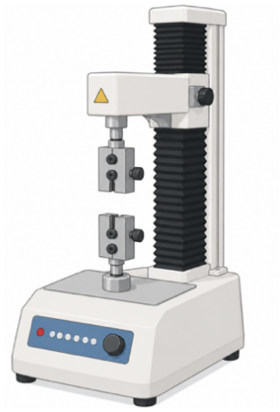


Figura 18. Texture Analyzer equipaggiato con un sistema di ancoraggio A/TG costituito da due morsetti (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

4.4.3 Quantificazione del collagene adsorbito

Il saggio colorimetrico dell'acido bicinconinico è stato utilizzato per quantificare indirettamente la quantità di collagene adsorbita sulla superficie degli *scaffold*. A tal fine, è stata determinata la concentrazione di collagene non adsorbito, presente nelle soluzioni di recupero raccolte al termine del processo di rivestimento (Figura 19).

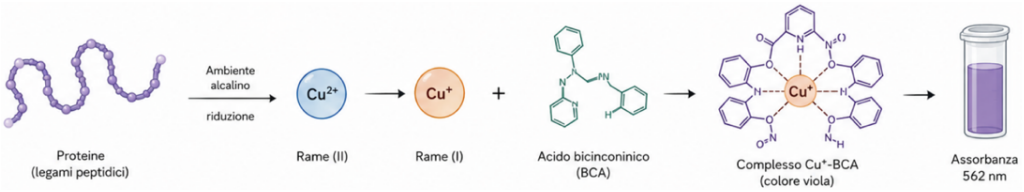


Figura 19. Rappresentazione schematica del principio del saggio colorimetrico BCA per la quantificazione delle proteine. In ambiente alcalino, le proteine favoriscono la riduzione degli ioni Cu^{2+} a Cu^{+}; quest'ultimo reagisce con il BCA, formando un complesso di colore viola, la cui assorbanza viene misurata a 562 nm (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

Per determinare la concentrazione di collagene nelle soluzioni di recupero, è stata preliminarmente costruita una curva di calibrazione utilizzando soluzioni a concentrazione nota dello stesso collagene impiegato per il coating. Gli standard e i campioni sono stati sottoposti alla medesima procedura analitica, miscelando ciascuna soluzione con il BCA Working Reagent in rapporto 1:8. La piastra da 96 pozzetti è stata quindi incubata a 37°C per 30 minuti, al riparo dalla luce, e l'assorbanza è stata misurata a 562 nm mediante uno spettrofotometro FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Aylesbury, UK). Le concentrazioni di collagene presenti nelle soluzioni di recupero sono state ricavate interpolando i valori di assorbanza ottenuti per i campioni sulla curva di calibrazione. Le analisi sono state eseguite su tre repliche indipendenti per ciascuna formulazione, effettuando una doppia lettura per ciascun campione.

La quantità di collagene adsorbito è stata determinata per differenza tra la quantità iniziale di collagene introdotta nel sistema (3 mg) e la quantità di collagene non adsorbita, quantificata nelle soluzioni di recupero. I risultati sono stati espressi come µg di collagene adsorbito per mg di *scaffold* ($\mu g \cdot mg^{-1}$) per le formulazioni TPUCOL, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL.

4.4.4 Caratterizzazione chimica

La caratterizzazione chimica delle nanofibre, sia non rivestite sia rivestite con collagene, è stata effettuata mediante spettroscopia FT-IR, al fine di identificare i principali gruppi funzionali presenti nei materiali e verificare eventuali variazioni associate al coating con collagene. Le analisi sono state eseguite utilizzando uno spettrometro Nicolet iS20 (Thermo Scientific, Italia), dotato di rivelatore DTGS. Gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo 400–4000 cm^{-1}, con una risoluzione di 4 cm^{-1} e mediante 32 scansioni per campione. Prima dell'analisi è stato acquisito lo spettro di fondo.

4.4.5 Analisi topografica

La morfologia superficiale e la topografia degli *scaffold* nanofibrosi sono state valutate mediante microscopia a forza atomica (AFM, Tosca 200, Anton Paar, Austria) (Figura 20). Le misure sono state effettuate in tapping mode, utilizzando un cantilever in silicio (AP-ARROW-EFM, Silicon SPM-Sensor, rivestimento in PtIr5) avente spessore di 3 µm, lunghezza di 240 µm, larghezza di 35 µm, frequenza di risonanza di 77.92 kHz e costante di forza pari a 2.8 N/m (Anton Paar, Austria). Sono state acquisite immagini AFM su un'area di scansione di 20 × 20 µm, utilizzando una velocità di scansione di 0,1 Hz e una risoluzione di 400 × 400 pixel. I parametri di rugosità superficiale Sa (rugosità media aritmetica) e Sq (rugosità quadratica media, RMS) sono stati utilizzati per caratterizzare la topografia superficiale degli *scaffold*.

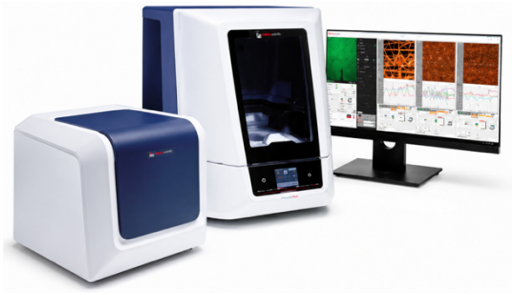


Figura 20. Tosca 200 Anton Paar per microscopia a forza atomica (AFM) (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

4.4.6 Proprietà viscoelastiche

L'analisi dinamica meccanica (Figura 21) è stata utilizzata per valutare le proprietà viscoelastiche degli *scaffold* nanofibrosi mediante un reometro-DMA MCR 702e MultiDrive (Anton Paar GmbH, Graz, Austria), utilizzando due configurazioni di prova: tensione (SRF-LIN) e torsione (SRF).



Figura 21. Analisi dinamica meccanica con cella in immersione (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

La configurazione in tensione ha consentito di caratterizzare la risposta del materiale a deformazioni longitudinali, mentre quella in torsione la risposta a deformazioni di taglio.

Le analisi sono state condotte con cella in immersione a 37°C, mantenendo i campioni immersi in acqua per l'intera durata della prova, al fine di simulare condizioni prossime all'ambiente fisiologico. Le analisi sono state eseguite su almeno tre repliche indipendenti per ciascuna condizione sperimentale. Per entrambe le configurazioni è stato inizialmente eseguito un *amplitude sweep* per individuare la regione di viscoelasticità lineare (LVR), seguito da un *frequency sweep* a deformazione costante nella LVR, variando la frequenza tra 0,1 e 10 Hz. Sono stati quindi determinati i moduli di conservazione E′ e G′, i moduli di perdita E″ e G″ e i relativi rapporti E″/E′ e G″/G′.

I parametri sperimentali sono stati impostati come riportato in Tabella 4a, b.

Tabella 4a, b. Parametri sperimentali e dimensioni dei campioni utilizzati per le prove di trazione (a) e torsione (b) con cella in immersione a 37°C.

a)

Amplitude sweep SRF-LIN

Sample dimensions			**Amplitude and frequency**		**Set value**	
W (mm)	**T** (mm)	**L** (mm)	**σ** Extensional Stress (∿) Profile: Ramp logarithmic	**f** Profile: Constant	**σ** Extensional Stress Profile: Proportional with initial	**Limitation: Force**
5	0.03 – 0.05	3	Initial: 0.01 MPa Final: 10 MPa	1 - 1.5 Hz	Initial: 0.012 MPa Factor: 120%	Minimum: 0.01 N

Frequency sweep SRF-LIN

Sample dimensions			**Amplitude and frequency**		**Set value**	
W (mm)	**T** (mm)	**L** (mm)	**σ** Extensional Stress (∿) Profile: Constant	**f** Profile: Ramp logarithmic	**σ** Extensional Stress Profile: Proportional with initial	**Limitation: Force**
5	0.03 – 0.05	5	LVR	Initial: 0.01 Hz Final: 10 Hz	Factor: 120%	Minimum: 0.01 N

b)

Amplitude sweep SRF

Sample dimensions			**Amplitude and frequency**	
W (mm)	**T** (mm)	**L** (mm)	**γ** Shear Strain (∿) Profile: Ramp logarithmic	**f** Profile: Constant
5	0.03 - 0.05	5	Initial: 0.01 % Final: 3 %	1 Hz

Frequency sweep SRF

Sample dimensions			**Amplitude and frequency**	
W (mm)	**T** (mm)	**L** (mm)	**γ** Shear Strain (∿) Profile: Constant	**f** Profile: Ramp logarithmic
5	0.03 - 0.05	5	LVR	Initial: 0.1 Hz Final: 10 Hz

4.4.7 Bagnabilità delle superfici

La bagnabilità superficiale delle fibre è stata valutata mediante la misura dell'angolo di contatto dinamico dell'acqua (θ) (Figura 22), parametro indicativo dell'interazione tra la superficie solida e la fase liquida. Le misure sono state effettuate a temperatura ambiente su *scaffold* non rivestiti e rivestiti di collagene, utilizzando un misuratore dell'angolo di Contatto DMe-211 Plus (Kyowa, Osaka, Giappone) e il software FAMAS. Una goccia di acqua (1 μL) è stata depositata sulla superficie di tre campioni distinti per ciascuna formulazione, effettuando le misure a 100, 500 e 1000 ms dalla deposizione. Il valore di θ è stato determinato mediante l'analisi del profilo della goccia acquisito dalla

telecamera CCD integrata nello strumento e analizzato tramite il software FAMAS.



Figura 22. Misuratore dell'Angolo di Contatto DMe-211 Plus (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

4.4.8 Degradazione *in vitro*

La degradazione *in vitro* degli *scaffold* elettrofilati a base di TPU e COS, sia non rivestiti sia rivestiti con collagene, è stata valutata in condizioni fisiologiche simulate. Prima dell'incubazione, tre campioni per ciascuna formulazione sono stati pesati allo stato secco, registrando il peso iniziale. I campioni sono stati quindi posti singolarmente in provette Eppendorf con una quantità sufficiente di PBS 1 × e incubati a 37°C in bagno termostatico (Figura 23).



Figura 23. Bagnetto termostatico utilizzato per l'incubazione degli *scaffold* in PBS a 37°C (immagine creata con Biorender®).

La degradazione è stata valutata a tempi prestabiliti di 1, 2, 4, 6 e 12 settimane. Al termine di ciascun periodo di incubazione, i campioni sono stati recuperati e pesati per determinare la variazione di massa rispetto al peso iniziale. La perdita di peso percentuale è stata calcolata sulla base della differenza tra il peso iniziale

e quello misurato al termine dell'incubazione, mentre la percentuale di massa residua è stata determinata mediante la relazione riportata di seguito.

$$(1)\ \text{Massa residua}\ (\%) = \frac{m_0}{m_t} \times 100$$

dove m_0 rappresenta la massa iniziale del campione, mentre m_t rappresenta la massa del campione al tempo *t* e *t* corrisponde ai diversi tempi di incubazione, ovvero 1, 2, 4, 6 e 12 settimane.

I campioni recuperati ai diversi tempi sono stati inoltre sottoposti ad analisi SEM, secondo la procedura descritta nel paragrafo 4.4.2, per valutare eventuali variazioni della morfologia e della struttura fibrosa. Per i campioni incubati per 12 settimane sono state inoltre eseguite prove meccaniche mediante DMA, al fine di valutare eventuali variazioni delle proprietà viscoelastiche conseguenti alla degradazione.

4.4.9 Proprietà antiossidanti

L'attività di scavenging dei radicali (RSA%) degli *scaffold* è stata valutata mediante il saggio DPPH (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania), basato sulla riduzione del radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH). Il test è stato eseguito in triplicato sulle formulazioni TPU, TPUCOS8, TPUCOS20, TPUCOL, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL. Per ciascuna formulazione sono stati pesati circa 10 mg di fibre, immersi in 1 mL di PBS 1× e incubati a temperatura ambiente per 24 h. Al termine dell'incubazione, gli estratti sono stati raccolti e sottoposti al saggio.

Ciascun estratto è stato miscelato con la soluzione di DPPH in rapporto 1:1 e incubato a 37°C per 30 minuti al riparo dalla luce. L'assorbanza è stata quindi misurata a 515 nm mediante spettrofotometro FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Aylesbury, UK). L'attività di radical scavenging (RSA%) è stata calcolata mediante la seguente equazione:

$$(2)\ RSA(\%) = \frac{A_0 - A_{sample}}{A_0} \times 100$$

dove A_0 rappresenta l'assorbanza del controllo e A_s l'assorbanza misurata dopo la reazione con l'estratto del campione. Valori più elevati di RSA% indicano una maggiore attività antiossidante.

4.4.10 Citotossicità *in vitro*

La citotossicità in vitro degli *scaffold* è stata valutata mediante metodo dell'estratto, utilizzando fibroblasti dermici umani normali (NHDFs) come modello cellulare, secondo le linee guida ISO 10993-5 (Figura 24). Per la preparazione degli estratti, i campioni sono stati posti a contatto con il mezzo di coltura secondo un rapporto superficie/volume di 6 $cm^2 \cdot mL^{-1}$, corrispondente all'estratto non diluito (100%), e di 3 $cm^2 \cdot mL^{-1}$, corrispondente all'estratto al 50%. I campioni sono stati incubati nel mezzo di coltura per 24 h a 37 °C. Le NHDFs sono state coltivate in DMEM integrato con 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS), 25 $\mu g \cdot mL^{-1}$amfotericina B, 10,000 $\mu g \cdot mL^{-1}$, streptomicina, 10,000 UI penicillina in condizioni standard (CO_2 Incubator, PBI International, Milano, Italia; 37°C, atmosfera al 5% di CO_2 e 95% RH) e successivamente esposte agli estratti per 24 h a 37°C. Le cellule coltivate nel mezzo di crescita (GM) sono state utilizzate come controllo. Le analisi sono state condotte mediante tre seminazioni cellulari indipendenti. La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio Alamar Blue. Al termine dell'esposizione, è stata aggiunta una soluzione di Alamar Blue al 10% (v/v) e le cellule sono state incubate al buio a 37°C per 3 h. La soluzione è stata quindi trasferita in una nuova piastra e la fluorescenza è stata misurata mediante spettrofluorimetro FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Aylesbury, UK), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 530 nm e di emissione di 590 nm.

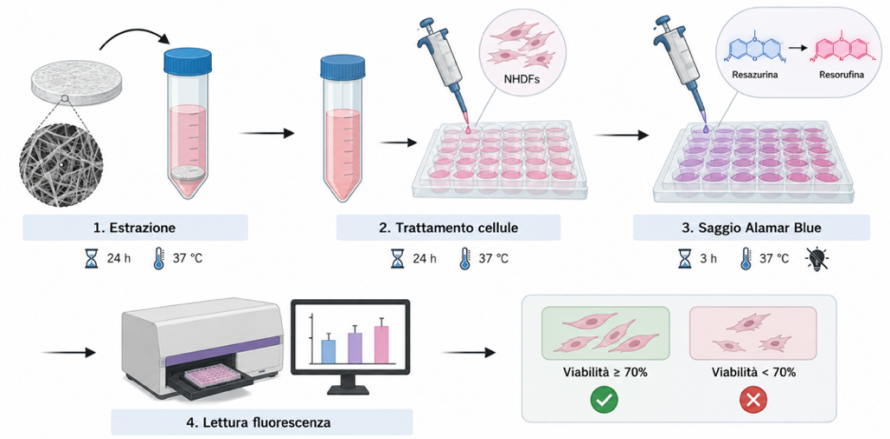


Figura 24. Rappresentazione schematica del principio del saggio Alamar Blue: la resazurina, di colore blu e non fluorescente, viene ridotta dalle cellule metabolicamente attive a resorufina, di colore rosa-rosso e altamente fluorescente. L'intensità della fluorescenza è correlata all'attività metabolica e alla vitalità cellulare (immagine creata con ChatGPT, OpenAI, 2026).

4.5 Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti almeno in triplicato ($n \geq 3$) e i risultati sono stati espressi come media ± deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA utilizzando il software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0{,}05$.

4.6 Risultati

4.6.1 Analisi morfologica e dimensionale degli *scaffold* non rivestiti di collagene

Come mostrato in Figura 25, gli *scaffold* ottenuti dopo 30 minuti di elettrofilatura hanno presentato, per tutte le formulazioni analizzate (TPU, TPUCOS2, TPUCOS8, TPUCOS14 e TPUCOS20), una struttura fibrosa omogenea, caratterizzata da fibre distribuite casualmente e prive di difetti.

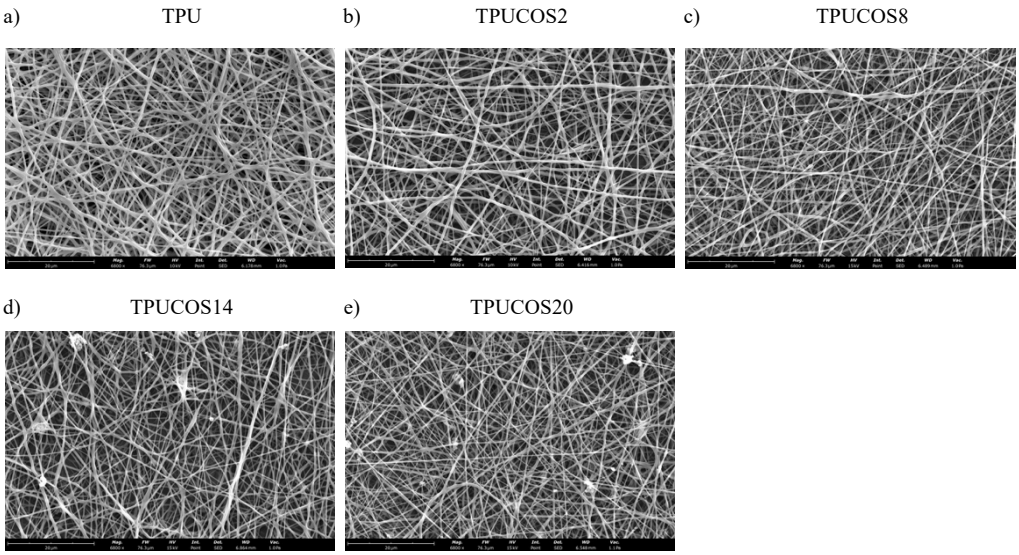


Figura 25. Immagini SEM rappresentative degli *scaffold* elettrofilati (a) TPU, (b) TPUCOS2, (c) TPUCOS8, (d) TPUCOS14 e (e) TPUCOS20 ottenute dopo 30 min di elettrofilatura, acquisite a 6800×.

Nelle formulazioni contenenti le concentrazioni più elevate di COS, in particolare TPUCOS14 e TPUCOS20, sono stati tuttavia osservati alcuni aggregati tra le fibre, la cui presenza potrebbe essere associata a una incompleta solubilizzazione di COS nella soluzione. Nonostante ciò, anche tali formulazioni hanno mantenuto una struttura prevalentemente nanofibrosa.

La caratterizzazione degli *scaffold* ottenuti dopo 4 ore di elettrofilatura ha confermato il mantenimento dell'architettura fibrosa osservata nei campioni ottenuti dopo 30 minuti, come mostrato nelle immagini SEM riportate in Figura 26. L'analisi dimensionale ha evidenziato il mantenimento del diametro delle fibre nell'intervallo nanometrico per tutte le formulazioni. Nel complesso, l'aumento della concentrazione di COS non ha determinato variazioni sostanziali del diametro medio delle fibre, indicando che l'incorporazione del COS fino alla concentrazione massima analizzata non ha alterato significativamente la dimensione delle fibre. Tra le formulazioni analizzate, TPUCOS14 ha mostrato la maggiore dispersione dei valori di diametro, come evidenziato dalla più elevata deviazione standard, indicando una maggiore variabilità dimensionale delle fibre.

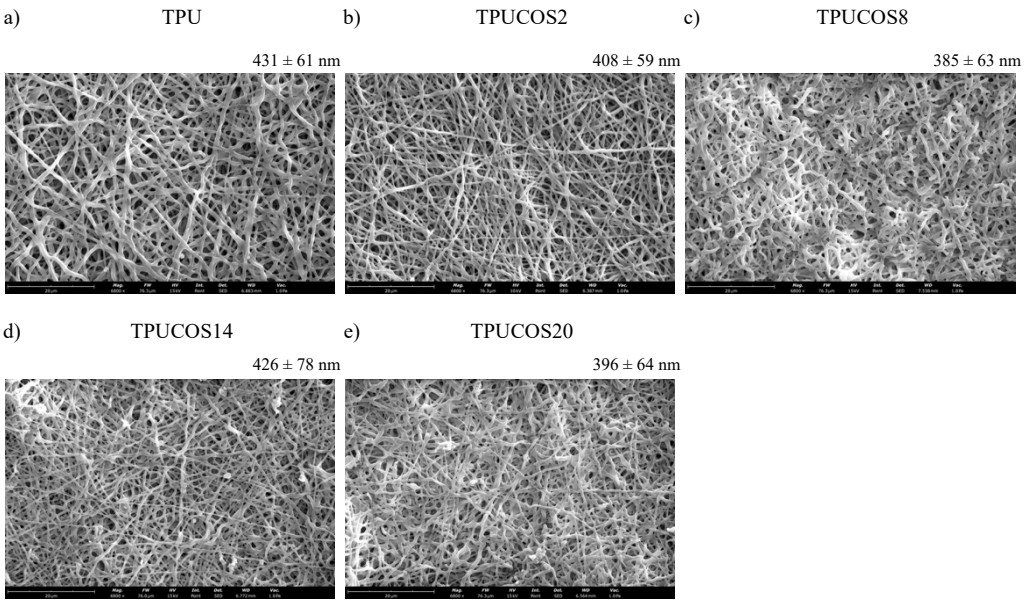


Figura 26. Immagini SEM rappresentative degli *scaffold* elettrofilati TPU, TPUCOS2, TPUCOS8, TPUCOS14 e TPUCOS20 ottenuti dopo 4 ore di elettrofilatura, acquisite a 6800×. Per ciascuna formulazione è riportato il diametro medio delle fibre, espresso come media ± SD (n=30).

4.6.2 Proprietà meccaniche degli *scaffold* non rivestiti di collagene

La caratterizzazione meccanica ha permesso di individuare gli *scaffold* che hanno mostrato le caratteristiche meccaniche più favorevoli, risultando pertanto i più promettenti per le successive applicazioni. Per quanto riguarda la resistenza a trazione (Figura 27a), il TPU ha mostrato i valori più elevati, pari a circa 8 MPa, sia allo stato secco sia dopo idratazione. con un andamento generalmente correlato all'aumento della sua concentrazione, ad eccezione di TPUCOS14, che ha mostrato una marcata diminuzione della resistenza meccanica. Il confronto tra la condizione a secco e dopo idratazione non ha evidenziato differenze statisticamente significative per le formulazioni contenenti COS, indicando che l'esposizione all'ambiente acquoso non ha determinato variazioni significative della resistenza a trazione degli *scaffold*. L'allungamento a rottura (Figura 27b) ha mostrato variazioni dipendente sia dalla composizione più marcate in funzione della formulazione e dello stato di idratazione. Il TPU ha evidenziato un aumento significativo dopo idratazione, passando da circa 275% a 370% (p≤0,01), mentre per TPUCOS2 è stata osservata una significativa riduzione

($p \leq 0{,}01$). TPUCOS8 ha mostrato una tendenza all'aumento dell'allungamento in condizioni di idratazione, mentre TPUCOS14 ha presentato variazioni più contenute. TPUCOS20 ha raggiunto in condizioni di idratazione il valore più elevato, pari a circa 400%, riducendosi significativamente a circa 250% dopo idratazione ($p \leq 0{,}001$). Nel complesso, le variazioni osservate in seguito all'idratazione non hanno evidenziato un andamento sistematico in funzione della concentrazione di COS.

Per quanto riguarda il modulo di Young (Figura 27c), i valori sono risultati compresi tra circa 1,3 e 2,2 MPa. Il TPU ha mostrato il valore più elevato, mentre l'introduzione di COS ha determinato una generale diminuzione del modulo elastico per tutte le formulazioni, senza differenze statisticamente significative.

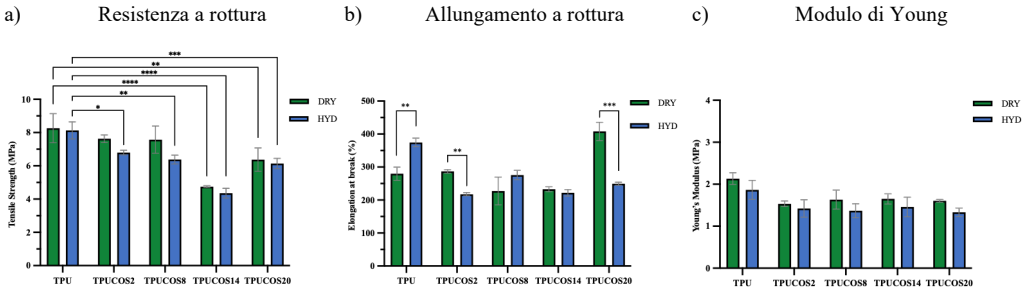


Figura 27. Caratterizzazione delle proprietà meccaniche: (a) resistenza a rottura (*tensile strength*), (b) allungamento a rottura (*elongation at break*), (c) modulo di Young degli *scaffold* nanofibrosi a base di TPU contenenti concentrazioni crescenti di COS, valutate in condizioni a secco (DRY) e dopo idratazione (HYD) (media ± SD, n=3). ANOVA a due vie. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0{,}05$. **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle caratterizzazioni morfologica e meccanica, le formulazioni TPU, TPUCOS8 e TPUCOS20 sono state selezionate per il successivo rivestimento con collagene di tipo I. Il TPU è stato scelto come formulazione di riferimento, in quanto privo di COS, mentre TPUCOS8 è stato selezionato come formulazione a contenuto intermedio di COS, caratterizzata da una morfologia omogenea e da proprietà meccaniche favorevoli. TPUCOS20, corrispondente alla massima concentrazione di COS analizzata, è stato invece selezionato in considerazione delle proprietà meccaniche mostrate.

4.6.3 Analisi morfologica e dimensionale degli *scaffold* rivestiti di collagene

Come mostrato in Figura 28a-c, il trattamento con collagene ha modificato l'aspetto superficiale delle fibre, in accordo con la deposizione del rivestimento. In tutte le formulazioni analizzate, tuttavia, l'architettura nanofibrosa è risultata preservata anche dopo il rivestimento, mantenendo una struttura costituita da fibre interconnesse e distribuite casualmente.

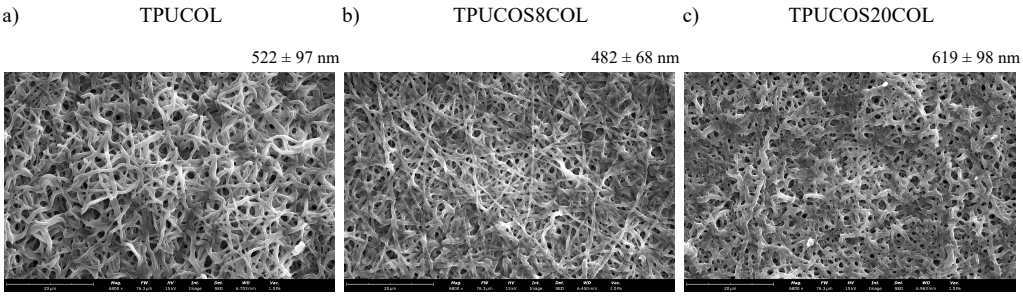


Figura 28. Immagini SEM rappresentative degli *scaffold* elettrofilati (a) TPU, (b) TPUCOS8 e (c) TPUCOS20 sottoposti a rivestimento con una sospensione di collagene (3 mg·mL^{-1}), acquisite a 6800×. Per ciascuna formulazione è riportato il diametro medio delle fibre, espresso come media ± SD (n=30).

L'analisi dimensionale ha evidenziato un aumento del diametro medio delle fibre in seguito al trattamento con collagene. In particolare, il diametro è passato da 431±61 nm a 522±97 nm (p≤0,01) per TPU, da 385±63 nm a 482±68 nm (p≤ 0,01) per TPUCOS8 e da 396±64 nm a 619±98 nm (p≤0,01) per TPUCOS20. L'incremento più pronunciato è stato osservato per TPUCOS20COL, che ha presentato il maggiore diametro medio dopo il rivestimento. Nonostante tale aumento, i diametri sono rimasti nell'intervallo submicrometrico e l'architettura fibrosa degli *scaffold* è risultata preservata.

4.6.4 Quantificazione del collagene adsorbito

Come riportato in Tabella 5, la quantità di collagene adsorbito è risultata differente tra le formulazioni analizzate. TPUCOL ha mostrato il valore più basso, pari a 55,52±18,61 µg·mg^{-1}. L'introduzione dell'8% di COS (TPUCOS8COL) ha determinato un aumento della quantità di collagene adsorbito, raggiungendo 214,04±68,66 µg·mg^{-1}. Il valore più elevato è stato

osservato per TPUCOS20COL, contenente il 20% di COS, con 534,25±95,43 µg·mg^{-1}.

Tabella 5. Quantità di collagene adsorbito dopo il processo di rivestimento degli *scaffold* nanofibrosi. I risultati sono espressi come media ± SD (n=3). ANOVA a una via. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0{,}05$. **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$ in confronto a TPUCOS20COL.

Formulazione	**Collagene adsorbito** (µg·mg^{-1})
TPUCOL	55,52 ± 18,61***
TPUCOS8COL	214,04 ± 68,66**
TPUCOS20COL	534,25 ± 95,43

4.6.5 Caratterizzazione chimica

La Figura 29 mostra gli spettri FT-IR dei singoli componenti degli *scaffold*, caratterizzati dalle principali bande di assorbimento riconducibili alle rispettive strutture chimiche.

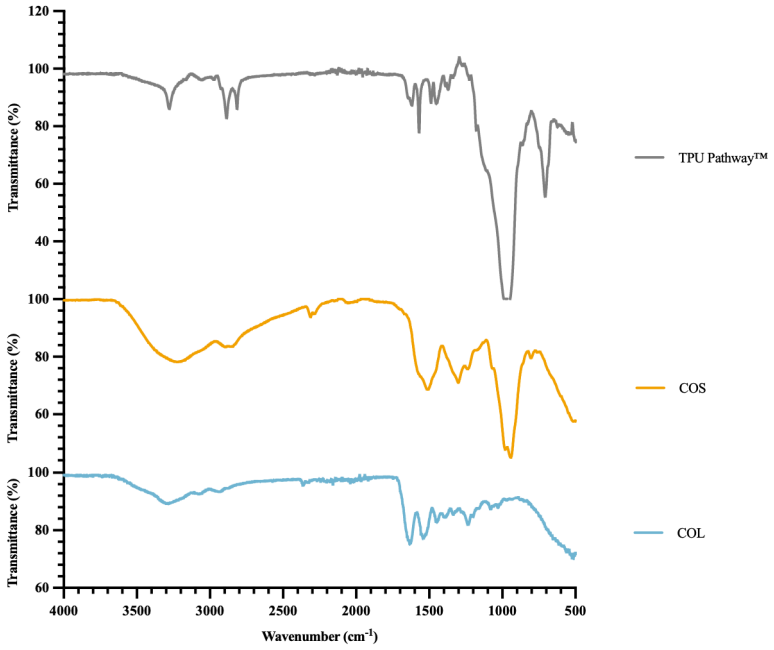


Figura 29. Spettri FT-IR del pellet di poliuretano termoplastico (TPU Pathway™, profilo grigio), della polvere di chitosano oligosaccaride (COS, profilo giallo) e del liofilizzato di collagene di tipo I (COL, profilo azzurro). Gli spettri sono riportati in funzione del numero d'onda (cm^{-1}) e della trasmittanza (%).

Nel TPU (profilo grigio), la banda nell'intervallo 3200–3500 cm^{-1} è attribuibile allo stretching dei gruppi N–H, mentre le bande a circa 2950–2850 cm^{-1} sono

associate allo stretching C–H dei gruppi alifatici. La banda nella regione di 1700 cm^{-1} è riconducibile allo stretching del gruppo carbonilico C=O delle funzioni uretaniche, mentre l'assorbimento intorno a 1530–1560 cm^{-1} è associato alla deformazione N–H. Le bande nella regione 1000–1200 cm^{-1} sono principalmente attribuibili alle vibrazioni C–O e C–O–C [35] .

Lo spettro del COS (profilo giallo) presenta una banda ampia nell'intervallo 3200–3500 cm^{-1}, associata agli stretching dei gruppi O–H e N–H, e una banda intorno a 2920 cm^{-1} attribuibile allo stretching C–H. Gli assorbimenti nelle regioni di circa 1650 e 1550 cm^{-1} sono riconducibili rispettivamente alle vibrazioni dell'Amide I e alla deformazione dei gruppi N–H/NH_2. Le bande comprese tra 1000 e 1150 cm^{-1} sono caratteristiche delle vibrazioni C–O e C–O–C dello scheletro polisaccaridico [34], [36], [54] .

Il collagene di tipo I (profilo azzurro) mostra il tipico profilo delle proteine, con una banda intorno a 3300 cm^{-1} attribuibile allo stretching N–H dell'Amide A e un assorbimento nell'area di 2900 cm^{-1} associato allo stretching C–H. Le principali bande caratteristiche del collagene sono rappresentate dall'Amide I, intorno a 1650 cm^{-1}, associata principalmente allo stretching C=O dei legami peptidici, dall'Amide II, intorno a 1550 cm^{-1}, correlata alle vibrazioni N–H e C–N, e dall'Amide III, nella regione 1200–1300 cm^{-1} [34], [54] .

La caratterizzazione FT-IR dei singoli componenti degli *scaffold* ha costituito il riferimento per la successiva analisi degli *scaffold* elettrofilati. In particolare, per ciascuna formulazione sono stati confrontati gli spettri degli *scaffold* non rivestiti e rivestiti: TPU vs TPUCOL (Figura 30a), TPUCOS8 vs TPUCOS8COL (Figura 30b) e TPUCOS20 vs TPUCOS20COL (Figura 30c), al fine di evidenziare eventuali modificazioni delle bande caratteristiche riconducibili alla presenza del rivestimento di collagene.

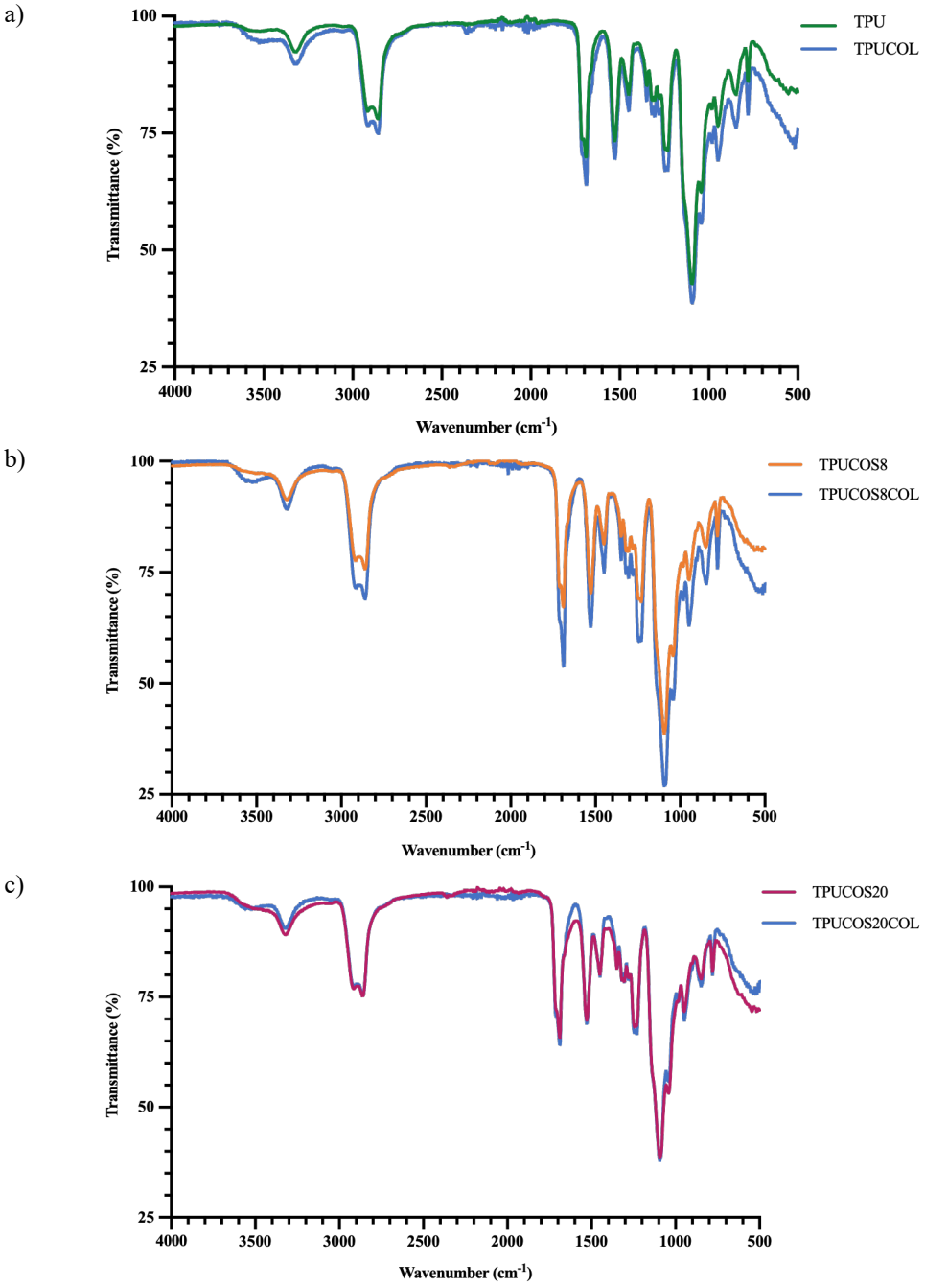


Figura 30. Confronto degli spettri FT-IR *degli scaffold* nanofibrosi a) non rivestiti TPU (profilo verde) e rivestiti di collagene, TPUCOL (profilo blu), b) non rivestiti TPUCOS8 (profilo arancio) e rivestiti di collagene, TPUCOS8COL (profilo blu), c) non rivestiti TPUCOS20 (profilo fucsia) e rivestiti di collagene, TPUCOS20COL (profilo blu). Gli spettri sono riportati in funzione del numero d'onda (cm^{-1}) e della trasmittanza (%).

Il confronto degli spettri FT-IR degli *scaffold* TPU e TPUCOL (Figura 30a) ha mostrato un profilo complessivamente analogo, con la conservazione delle principali bande caratteristiche della matrice poliuretanica. Nello *scaffold*

rivestito di collagene sono state osservate variazioni nell'intensità e nella forma di alcune bande, in particolare nelle regioni intorno a 3300, 1700, 1500 e 1200–1300 cm^{-1}, riconducibili alle principali bande ammidiche del collagene.

Il confronto degli spettri FT-IR degli *scaffold* TPUCOS8 e TPUCOS8COL (Figura 30b) ha evidenziato la presenza delle principali bande associate alla matrice poliuretanica, accompagnate dal contributo del COS. A seguito del rivestimento di collagene, lo spettro di TPUCOS8COL ha mostrato una variazione più evidente della banda nella regione intorno a 3300 cm^{-1}. Ulteriori variazioni sono state osservate nell'intervallo 1700–1500 cm^{-1}, compatibili con il contributo della componente proteica introdotta mediante il rivestimento. Nella regione compresa tra 1200 e 1000 cm^{-1}, sono state inoltre osservate variazioni del profilo spettrale.

Infine, l'aumento della concentrazione di COS al 20% w/TPU w ha determinato, come atteso, un contributo più marcato della componente polisaccaridica al profilo FT-IR dello *scaffold* TPUCOS20 (Figura 30c). A seguito del rivestimento, lo spettro di TPUCOS20COL ha mostrato variazioni nell'intensità e nella forma della banda nella regione intorno a 3300 cm^{-1}, mentre piccole variazioni sono state osservate nelle regioni comprese tra 1700–1500 e 1200–1000 cm^{-1}. Tali variazioni sono risultate compatibili con il contributo delle componenti proteica e polisaccaridica.

4.6.6 Proprietà meccaniche degli *scaffold* rivestiti di collagene

A livello di resistenza a trazione (Figura 31a), gli *scaffold* rivestiti di collagene hanno mostrato valori compresi tra circa 6,5 e 8 MPa. TPUCOL ha presentato i valori maggiori, prossimi a 8 MPa, senza variazioni rilevanti tra le condizioni a secco e idratata.

Le formulazioni contenenti COS hanno mostrato valori lievemente inferiori rispetto a TPUCOL. In particolare, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL hanno evidenziato una moderata diminuzione della resistenza a trazione dopo idratazione. Tuttavia, le differenze tra le condizioni a secco e idratata non sono risultate statisticamente significative, indicando che l'idratazione non ha modificato significativamente la resistenza a trazione degli *scaffold* rivestiti.

L’allungamento a rottura (Figura 31b) ha mostrato differenze principalmente associate alla composizione delle fibre. TPUCOL ha presentato il valore più elevato, pari a circa 380% in condizioni a secco e 330% dopo idratazione. TPUCOS8COL ha mostrato valori inferiori, prossimi al 200%, senza variazioni rilevanti tra le condizioni a secco e idratato. TPUCOS20COL ha invece raggiunto circa 270% in condizioni a secco, riducendosi a circa 200% dopo idratazione.

Per quanto riguarda il modulo di Young (Figura 31c), TPUCOL ha mostrato il valore più elevato in condizioni a secco, pari a circa 3 MPa, mentre le formulazioni contenenti COS hanno presentato valori inferiori. In tutte le formulazioni è stata osservata una tendenza alla diminuzione del modulo dopo idratazione, particolarmente evidente per TPUCOL, senza tuttavia evidenziare differenze statisticamente significative tra le condizioni a secco e idratate.

Nel complesso, il rivestimento con collagene non ha determinato variazioni sostanziali delle proprietà meccaniche rispetto agli *scaffold* non rivestiti. Le variazioni più evidenti sono state osservate per l’allungamento a rottura, mentre resistenza a trazione e modulo di Young hanno mostrato differenze più contenute. Anche dopo idratazione, le proprietà meccaniche degli *scaffold* rivestiti sono risultate sostanzialmente preservate.

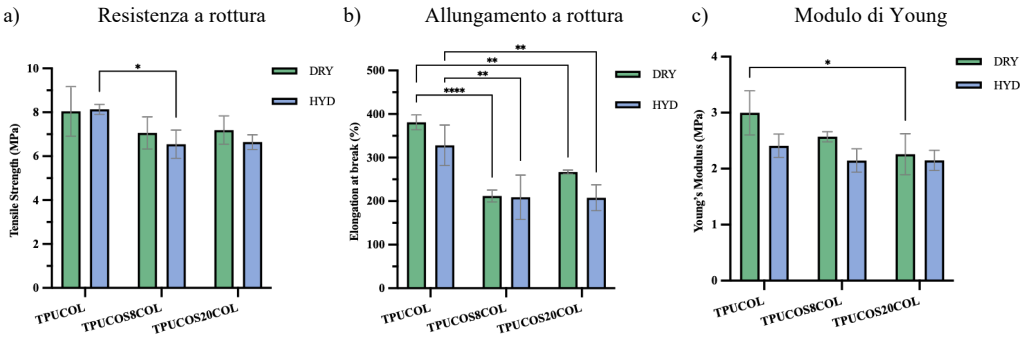


Figura 31. Caratterizzazione delle proprietà meccaniche: (a) resistenza a rottura (tensile strength), (b) allungamento a rottura, (c) modulo di Young degli *scaffold* nanofibrosi rivestiti di collagene di tipo I (TPUCOL, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL) valutate in condizioni a secco (DRY) e dopo idratazione (HYD) (media ± SD, *n*=3). ANOVA a due vie. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0{,}05$. *$p \leq 0{,}05$; **p≤0,01; ***$p \leq 0{,}001$; ****$p \leq 0{,}0001$.

4.6.7 Analisi topografica

In Figura 32a-e sono riportate le ricostruzioni tridimensionali AFM degli *scaffold* TPU, TPUCOS2, TPUCOS8, TPUCOS14 e TPUCOS20. In tutte le formulazioni è stata osservata una struttura tridimensionale costituita dalla sovrapposizione di più elementi fibrosi, con variazioni di altezza della superficie nell'area analizzata.

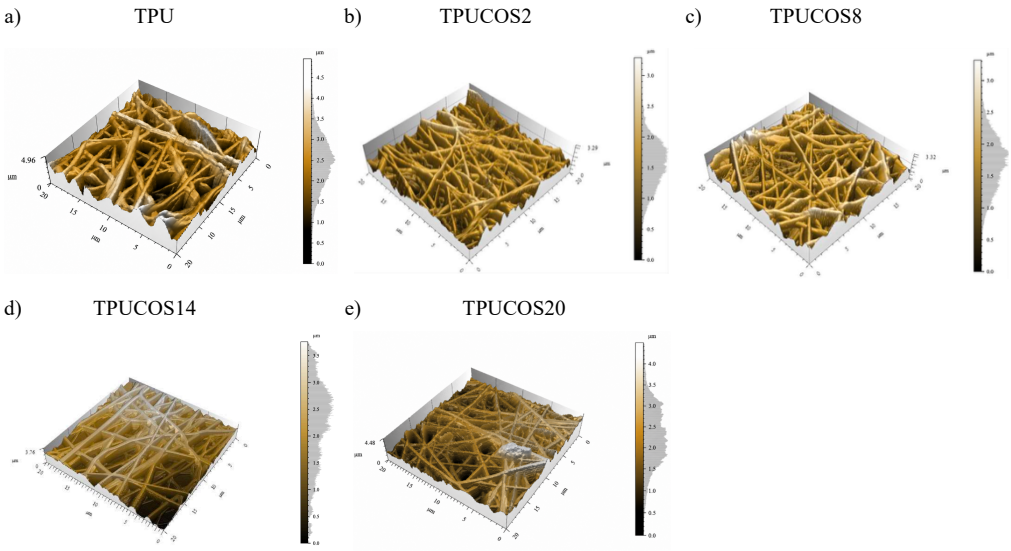


Figura 32. Ricostruzioni topografiche tridimensionali AFM (20 × 20 µm) degli *scaffold* (a) TPU, (b) TPUCOS2, (c) TPUCOS8, (d) TPUCOS14 e (e) TPUCOS20. Le immagini mostrano la morfologia superficiale e le relative variazioni di altezza.

Il confronto tra le diverse formulazioni ha evidenziato differenze nel profilo topografico in funzione della composizione dello *scaffold*. Il TPU ha presentato variazioni di altezza comprese indicativamente tra 0 e 5 µm, mentre TPUCOS2 e TPUCOS8 ha mostrato un profilo più contenuto, con valori massimi di circa 3,3 µm. Per TPUCOS14 e TPUCOS20 si sono osservate nuovamente variazioni di altezza maggiori, con valori massimi rispettivamente di circa 3,8 e 4,5 µm. Nella formulazione TPUCOS20 è risultato evidente un agglomerato superficiale, compatibile con la presenza di COS non completamente solubilizzato già osservata nelle immagini SEM. Tale agglomerato potrebbe contribuire alle maggiori variazioni di altezza osservate nella ricostruzione topografica del campione. L'analisi della rugosità superficiale mediante AFM ha evidenziato differenze tra le diverse formulazioni. Negli *scaffold* non rivestiti, il TPU puro

ha mostrato valori di Sa e Sq pari rispettivamente a 0,55 e 0,70 µm. L'introduzione di COS ha determinato una riduzione della rugosità alle concentrazioni più basse, con valori di Sa pari a 0,31 e 0,35 µm per TPUCOS2 e TPUCOS8, rispettivamente. A concentrazioni maggiori, la rugosità è invece aumentata, raggiungendo i valori più elevati per TPUCOS14 (Sa = 0,62 µm; Sq = 0,77 µm), mentre TPUCOS20 ha mostrato valori leggermente inferiori (Sa = 0,54 µm; Sq = 0,67 µm).

Le ricostruzioni tridimensionali degli *scaffold* rivestiti con collagene sono riportate in Figura 33a-c. Anche dopo il rivestimento, la struttura fibrosa è risultata chiaramente riconoscibile nelle tre formulazioni analizzate. TPUCOL ha presentato variazioni di altezza fino a circa 5 µm, mentre TPUCOS8COL ha mostrato valori massimi di circa 4,4 µm. La maggiore variazione di altezza è stata osservata per TPUCOS20COL, con valori fino a circa 6,5 µm. Il confronto tra le formulazioni ha evidenziato pertanto differenze nel profilo topografico superficiale, con una maggiore variabilità di altezza nel campione contenente il 20% di COS. Il rivestimento di collagene ha determinato una maggiore rugosità superficiale rispetto al TPU puro, con valori di Sa e Sq pari a 0,88 e 1,08 µm per TPUCOL. TPUCOS8COL ha mostrato valori intermedi (Sa = 0,57 µm; Sq = 0,69 µm), mentre TPUCOS20COL ha presentato i valori più elevati, con Sa = 1,22 µm e Sq = 1,46 µm.

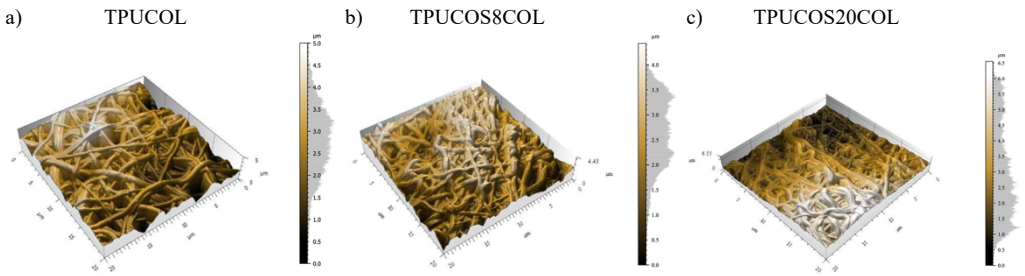


Figura 33. Ricostruzioni topografiche tridimensionali AFM (20 × 20 µm) degli *scaffold* (a) TPUCOL, (b) TPUCOS8COL e (c)TPUCOS20COL. Sono riportate le variazioni di altezza della superficie per le diverse formulazioni.

4.6.6 Proprietà viscoelastiche

Come mostrato in Figura 34a, i campioni contenenti COS hanno mostrato, nel complesso, valori di E' superiori rispetto al TPU, suggerendo una maggiore

rigidezza della matrice. Tuttavia, le differenze tra le formulazioni non sono risultate statisticamente significative e non è emersa una relazione diretta tra la concentrazione di COS e il valore di E'. Tale comportamento potrebbe essere dovuto, almeno in parte, all'immersione dei campioni in acqua, che potrebbe influenzare le interazioni tra i componenti della matrice e contribuire alla variabilità della risposta viscoelastica. Per tutte le formulazioni, E' è inoltre aumentato all'aumentare della frequenza, come atteso per materiali viscoelastici. I valori di tanδ, inferiori all'unità in tutte le condizioni analizzate, hanno evidenziato la predominanza della componente elastica su quella viscosa.

Sotto sollecitazione torsionale, il modulo G' ha mostrato un analogo incremento con la frequenza. I campioni contenenti COS hanno presentato valori generalmente comparabili o superiori rispetto al TPU di riferimento, senza tuttavia evidenziare una relazione diretta con la concentrazione di COS. Anche in questo caso, pertanto, l'effetto della frequenza è risultato più marcato rispetto a quello della composizione. I valori di tanδ sono rimasti inferiori all'unità in tutte le condizioni, confermando il comportamento prevalentemente elastico dei campioni, sebbene le variazioni osservate tra formulazioni e frequenze indichino una modulazione della componente dissipativa (Figura 34b).

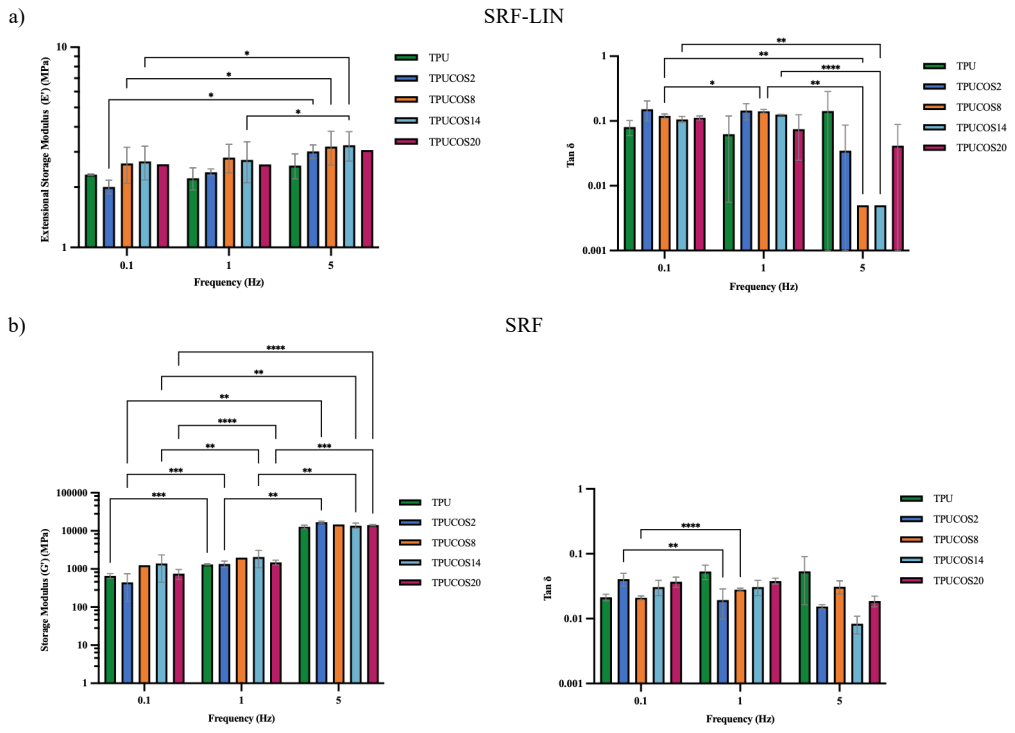


Figura 34. Frequency Sweep test in (a) SRF-LIN e (b) SRF a 37°C con cella in inversione. I valori di E', G' e tanδ degli *scaffold* non rivestiti di collagene sono riportati alle frequenze di 0,1, 1 e 5 Hz ed espressi come media ± SD (n=3). ANOVA a due vie. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0{,}05$. **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$; ****$p \leq 0{,}0001$.

Come mostrato in Figura 35a, gli scaffold rivestiti con collagene di tipo I (TPUCOL, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL) hanno presentato un andamento analogo a quello precedentemente osservato per i corrispettivi sistemi elettrofilati non rivestiti, con un moderato incremento del modulo E' all'aumentare della frequenza per tutte le formulazioni, a conferma della natura viscoelastica e della dipendenza dalla frequenza dei sistemi analizzati. I valori di tanδ sono risultati inferiori all'unità in tutte le condizioni considerate, indicando una predominanza della componente elastica su quella viscosa. In particolare, è stato osservato un incremento di tanδ tra 0,1 e 1 Hz, seguito da una diminuzione a 5 Hz.

Sottoponendo gli *scaffold* a sollecitazione torsionale (Figura 35b), il modulo G' è aumentato significativamente all'aumentare della frequenza solo per TPUCOL, mentre è rimasto sostanzialmente costante per i sistemi contenenti COS. I valori di tanδ sono risultati inferiori all'unità per tutte le formulazioni e alle frequenze analizzate, confermando il comportamento prevalentemente elastico dei campioni. Per TPUCOS8COL e TPUCOS20COL è stato osservato un incremento di tanδ all'aumentare della frequenza, sebbene tale variazione non sia risultata statisticamente significativa.

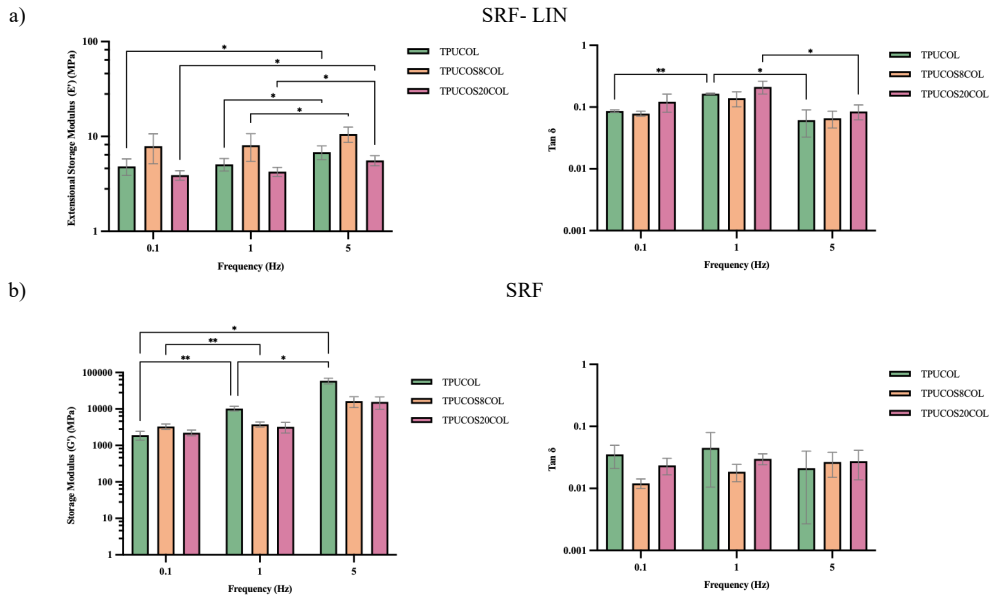


Figura 35. Frequency Sweep test in (a) SRF-LIN e (b) SRF a 37°C con cella in immersione. I valori di E', G' e tanδ degli *scaffold* rivestiti di collagene sono riportati alle frequenze di 0,1, 1 e 5 Hz ed espressi come media ± SD (n=3). ANOVA a due vie. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0,05$. *$p \leq 0,05$; **$p \leq 0,01$.

4.6.7 Bagnabilità delle superfici

Come mostrato in Figura 36a, il TPU puro ha mostrato, a 100 ms, un angolo di contatto pari a 109±3,2°, indicativo di una superficie prevalentemente idrofobica [55]. Con l'aumentare del tempo di acquisizione, l'angolo di contatto è progressivamente diminuito, raggiungendo valori di 96±5,3° a 500 ms e 78,6±8,5° a 1000 ms, evidenziando una progressiva interazione della goccia con la matrice fibrosa [56] , associata alla penetrazione e parziale assorbimento del liquido all'interno della struttura porosa. L'incorporazione di COS ha determinato, come previsto per un componente idrofilo, una riduzione dell'angolo di contatto iniziale rispetto al TPU puro. A 100 ms sono stati registrati valori pari a 100,5±3,4° per TPUCOS2, 99,6±4,3° per TPUCOS8, 98,8±1,3° per TPUCOS14 e 98,9±2,9° per TPUCOS20. All'aumentare del tempo di acquisizione, tutte le formulazioni non rivestite hanno mostrato una diminuzione dell'angolo di contatto. A 1000 ms, i valori sono risultati pari a 78,6±1,6° per TPUCOS2, 80,4±5,9° per TPUCOS8, 76,7±4° per TPUCOS14 e 83,4±7,7° per TPUCOS20. Per valutare l'effetto del rivestimento di collagene sulla bagnabilità superficiale, sono state quindi analizzate le formulazioni rivestite. TPUCOL ha mostrato valori di angolo di contatto pari a 97,3±6,7°, 91,6±5,1° e 92,8±2,8° a 100, 500 e 1000 ms, rispettivamente. Per TPUCOS8COL sono stati ottenuti valori di 106,2±6,0°, 102,2±5,5° e 98,0±4,6°, mentre TPUCOS20COL ha mostrato valori pari a 95,7±2,2°, 97,6±2,1° e 96,5±1,8° (Figura 36a). A differenza degli *scaffold* non rivestiti, i campioni rivestiti di collagene hanno mostrato variazioni più contenute nel tempo e quindi una maggiore stabilità. Il confronto complessivo tra le diverse formulazioni e i tempi di acquisizione è riportato nella Figura 36b.

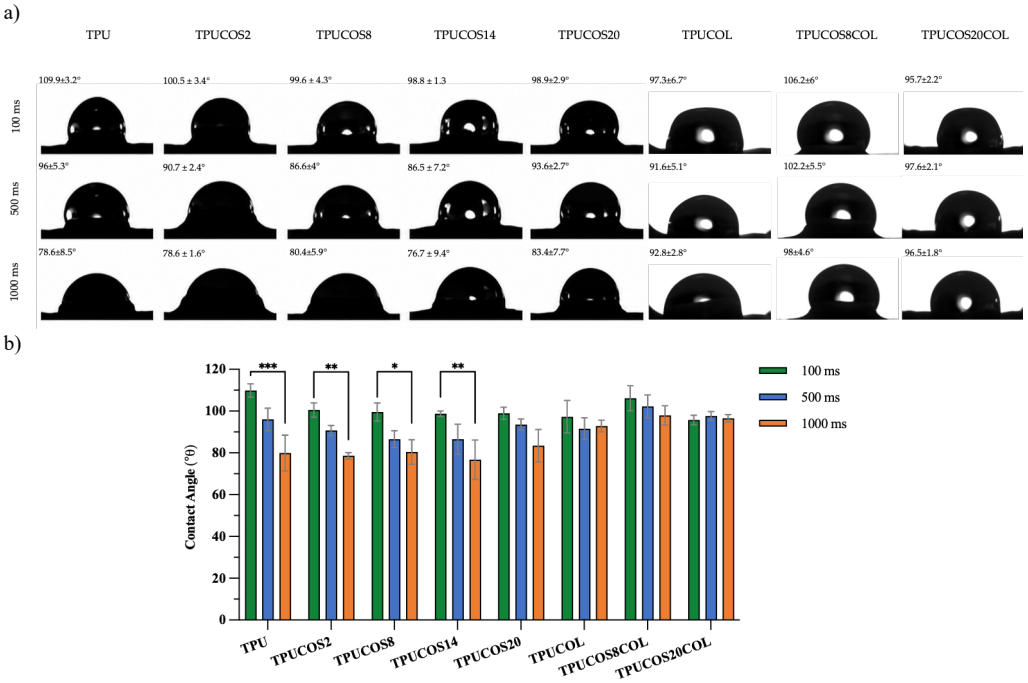


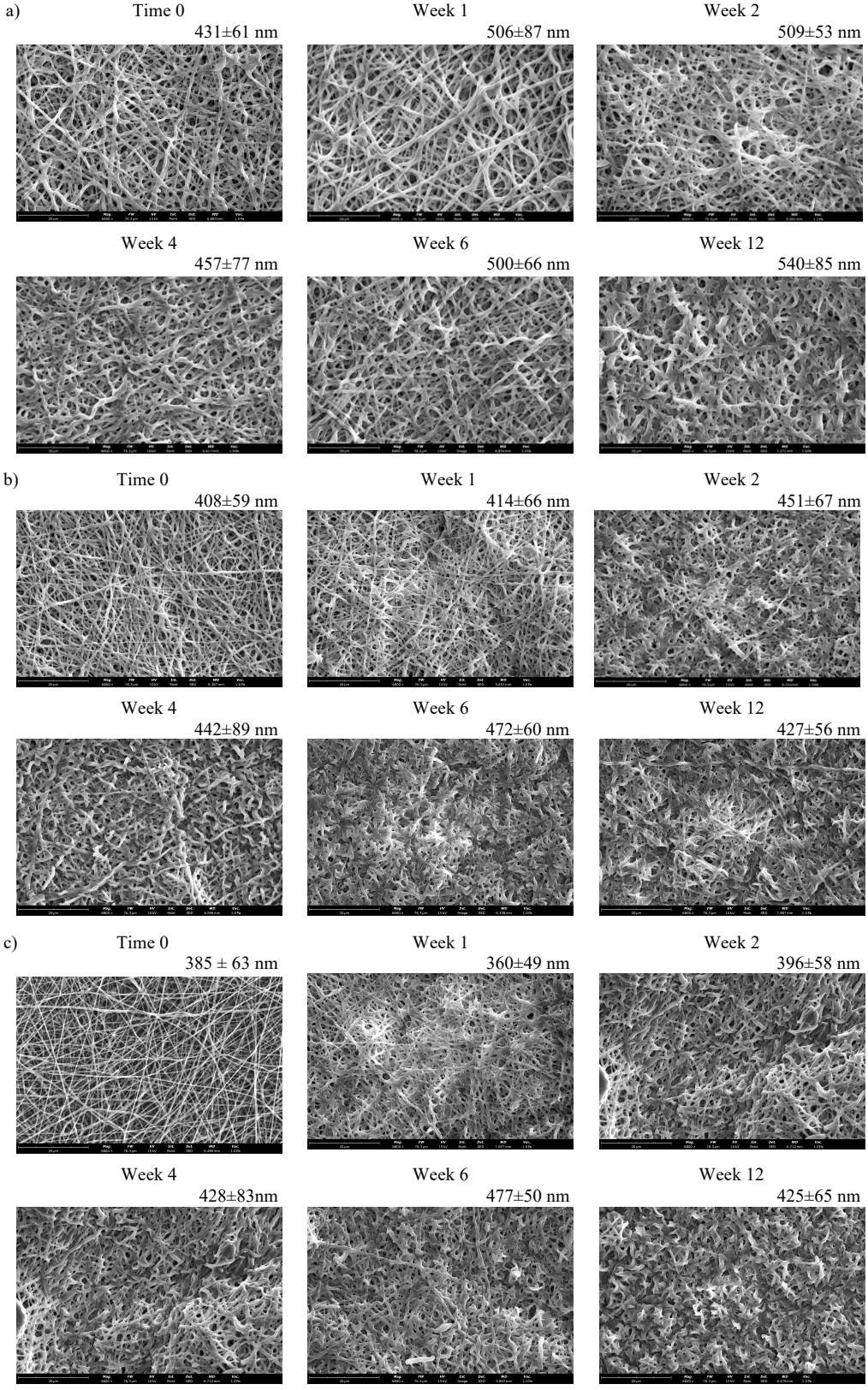
Figura 36. Misure dell'angolo di contatto degli *scaffold* elettrofilati TPU, TPUCOS2, TPUCOS8, TPUCOS14, TPUCOS20, TPUCOL, TPUCOS8COL, TPUCOS20COL acquisite a 100, 500 e 1000 ms: (a) immagini rappresentative delle gocce depositate sulla superficie degli *scaffold*, con i corrispondenti valori di angolo di contatto, (b) confronto dei valori di angolo di contatto tra le diverse formulazioni ai differenti tempi di acquisizione. I valori sono espressi come media ± SD (n=3). ANOVA a due vie. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0{,}05$. *p≤0,05; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$.

4.6.8 Degradazione *in vitro*

Nel complesso, gli *scaffold* non rivestiti hanno mantenuto la propria architettura fibrosa durante le 12 settimane di incubazione (Figura 37a-e). Nel corso dell'incubazione sono state osservate modificazioni morfologiche locali, principalmente riconducibili a una maggiore irregolarità e a un apparente addensamento delle fibre, più evidenti ai tempi avanzati.

Il TPU puro ha mantenuto la morfologia complessiva della rete fibrosa, mostrando tuttavia un incremento del diametro medio, da 431 ± 61 nm al tempo iniziale a 540±85 nm dopo 12 settimane. Tale variazione è stata associata a un lieve rigonfiamento delle fibre superficiali. Per le formulazioni contenenti COS, TPUCOS2 ha mostrato un diametro medio pari a 408±59 nm al tempo iniziale e 427±56 nm dopo 12 settimane, mentre TPUCOS8 ha evidenziato un incremento da 385±63 nm a 425±65 nm. TPUCOS14 ha mostrato una variazione minima,

da 426±78 nm a 420±64 nm, mentre TPUCOS20 ha evidenziato un lieve incremento, da 396±64 nm a 420±64 nm.



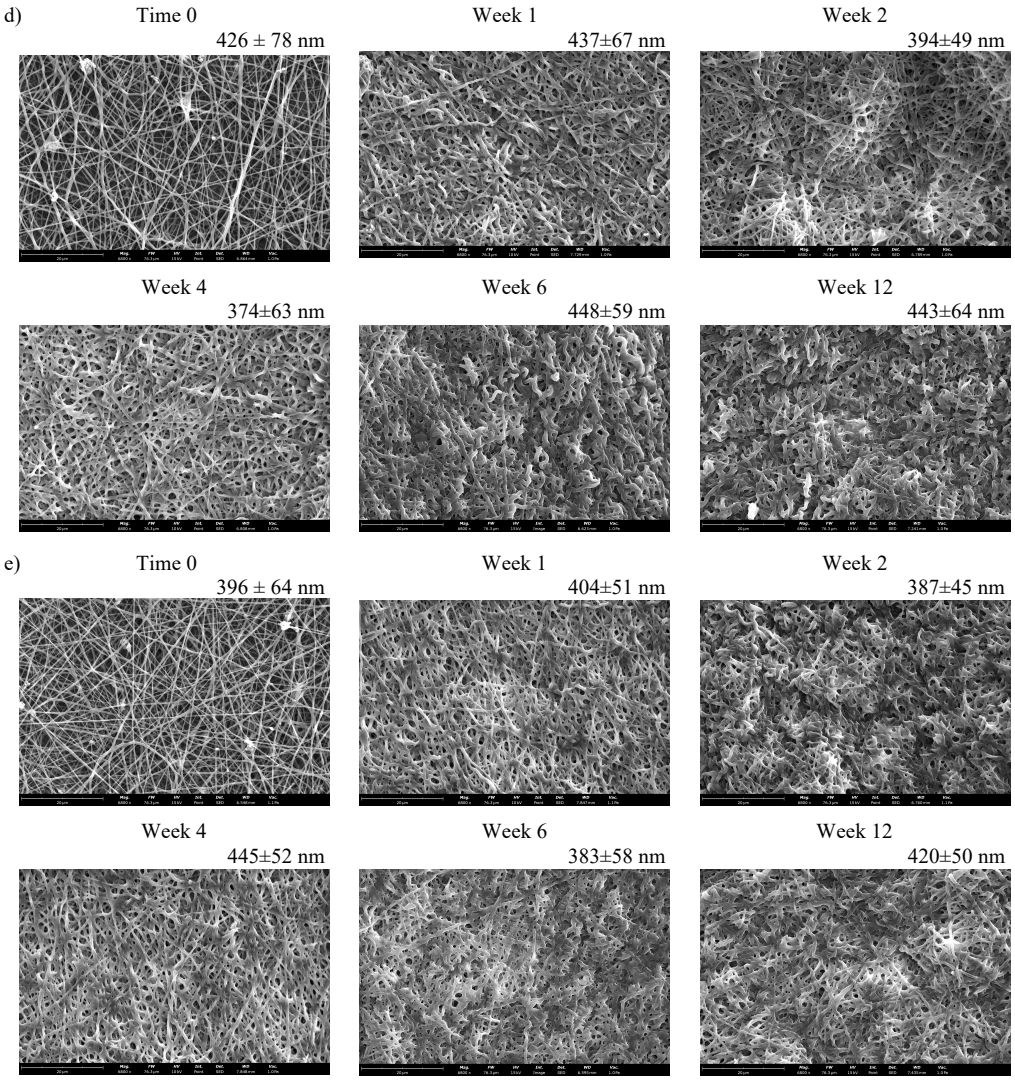
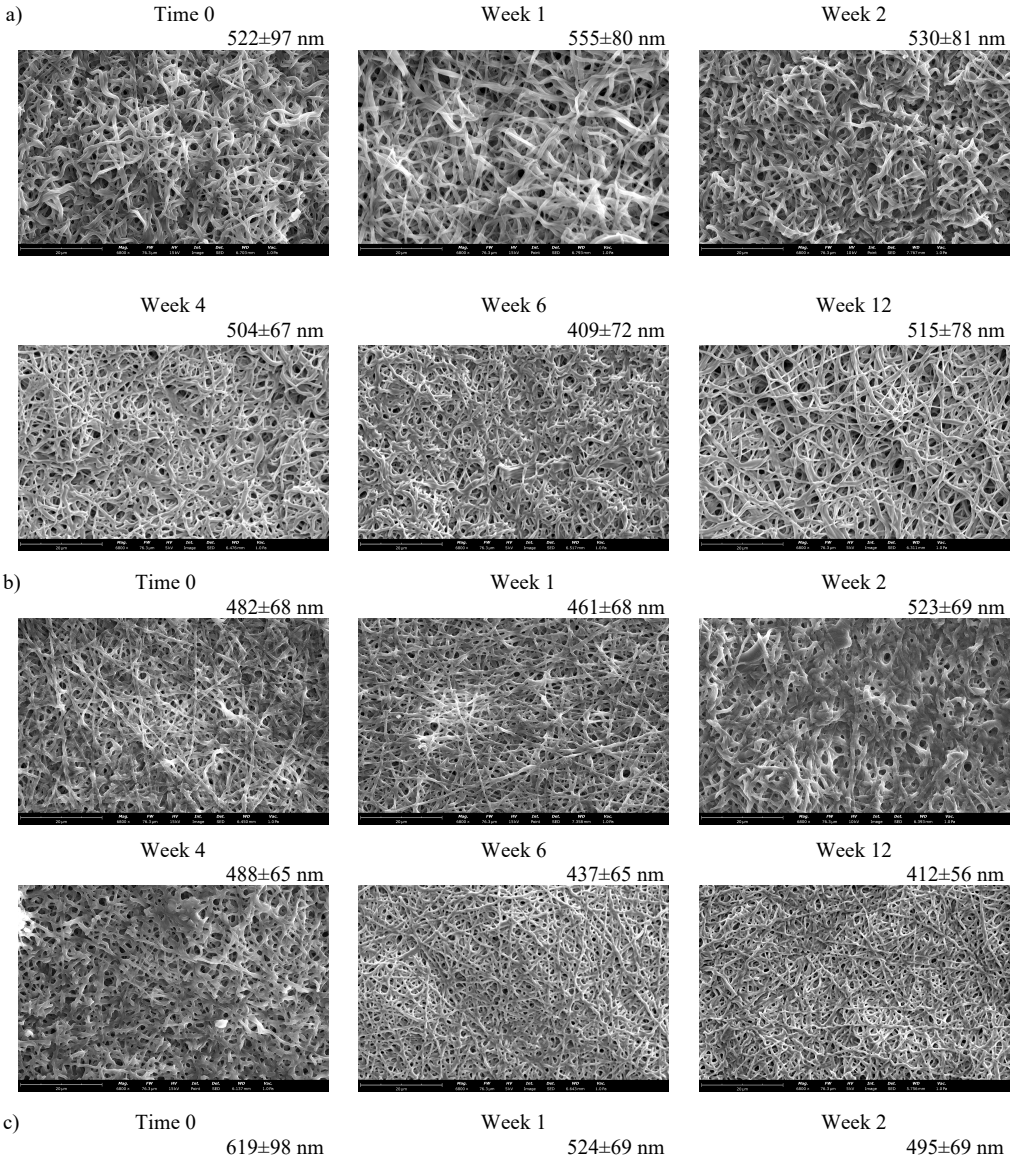


Figura 37. Immagini SEM rappresentative degli *scaffold* elettrofilati non rivestiti (a) TPU, (b) TPUCOS2, (c) TPUCOS8, (d) TPUCOS14 e (e) TPUCOS20, prima dell'incubazione (tempo 0) e dopo i tempi selezioni di incubazione in PBS a 37 °C. I valori sono espressi come media ± SD (*n*=30).

Anche gli *scaffold* rivestiti di collagene hanno mantenuto complessivamente la propria architettura fibrosa durante le 12 settimane di incubazione in PBS a 37°C (Figura 38a-c). Per TPUCOL e TPUCOS8COL modificazioni morfologiche locali nel corso dell'incubazione, caratterizzate principalmente da una maggiore irregolarità e da un apparente addensamento delle fibre, senza tuttavia compromettere la continuità della rete fibrosa. Per TPUCOS20COL è stata osservata una progressiva riorganizzazione della rete e variazioni degli spazi interfibrillari, particolarmente marcate a 2 e 4 settimane. Tale comportamento potrebbe essere ricondotto, almeno in parte, alla maggiore quantità di collagene

presente nel rivestimento e al suo progressivo rilascio durante l'incubazione, con conseguente modificazione dell'organizzazione superficiale dello *scaffold*. Ai tempi più avanzati, la struttura fibrosa è risultata nuovamente chiaramente riconoscibile. Dal punto di vista dimensionale, TPUCOL ha mostrato una variazione minima del diametro medio delle fibre, da 522±97 nm al tempo iniziale a 515±78 nm dopo 12 settimane. TPUCOS8COL ha invece evidenziato una diminuzione da 482±68 nm a 412±56 nm, mentre TPUCOS20COL ha mostrato una riduzione più marcata, da 619±98 nm a 449±70 nm.



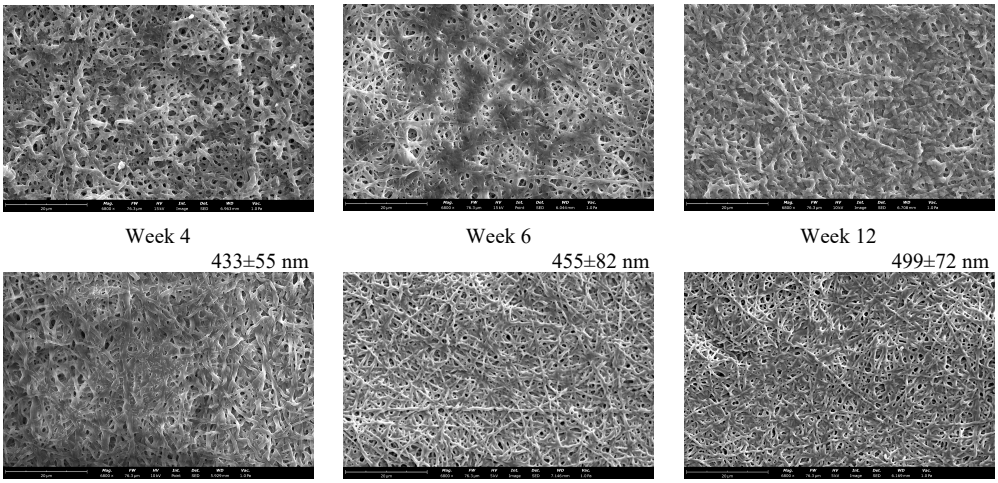


Figura 38. Immagini SEM rappresentative degli *scaffold* elettrofilati rivestiti (a) TPUCOL, (b) TPUCOS8COL e (c) TPUCOS20COL, prima dell'incubazione (tempo 0) e dopo i tempi selezionati di incubazione in PBS a 37°C. I valori sono espressi come media ± SD (*n*=30).

La perdita di massa degli *scaffold* durante l'incubazione in PBS a 37°C è riportata in Figura 39a, b. Il TPU puro ha mostrato una elevata stabilità nel tempo, con una perdita di massa massima di circa il 4% e senza variazioni significative durante il periodo di incubazione. Anche TPUCOS2 ha mantenuto valori contenuti e non significativamente differenti dal TPU. Al contrario, l'aumento del contenuto di COS ha determinato una maggiore perdita di massa, con valori massimi di circa 11% ($p \leq 0{,}001$), 16% ($p \leq 0{,}0001$) e 20% ($p \leq 0{,}0001$) per TPUCOS8, TPUCOS14 e TPUCOS20, rispettivamente a 12 settimane.

Nei sistemi rivestiti di collagene (Figura 39b), TPUCOL ha mostrato una perdita di massa massima di circa il 10%. Tale valore, superiore a quello osservato per il TPU puro, può essere associato anche alla progressiva perdita della componente di collagene durante l'incubazione. TPUCOS8COL ha raggiunto una perdita di massa di circa il 16% ($p \leq 0{,}01$) dopo 12 settimane, risultando significativamente superiore a TPUCOL allo stesso tempo sperimentale, mentre TPUCOS20COL ha mostrato valori compresi indicativamente tra il 4 e il 10%, senza differenze statisticamente significative rispetto a TPUCOL.

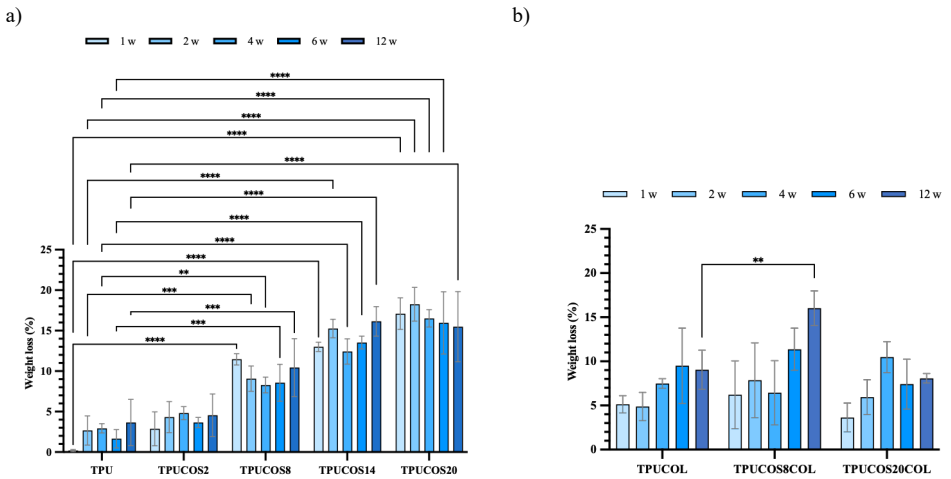


Figura 39. Perdita di peso (%) degli *scaffold* (a) non rivestiti di collagene TPU, TPUCOS2, TPUCOS8, TPUCOS14 e TPUCOS20 e (b) rivestiti di collagene TPUCOL, TPUCOS8COL, TPUCOS20COL ai tempi prestabiliti di incubazione in PBS a 37°C. I dati sono espressi come media ± SD (*n*=3). ANOVA a due vie. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0{,}05$. **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$; ****$p \leq 0{,}0001$.

4.6.9 Proprietà antiossidanti

Il TPU puro ha mostrato una capacità di scavenging dei radicali molto limitata, mentre l'introduzione del COS ha determinato un incremento del potenziale antiossidante, progressivamente maggiore all'aumentare della sua concentrazione, evidenziando il ruolo del COS nel conferire questa proprietà agli *scaffold* [11], [36]. Il valore di RSA ha raggiunto circa il 50% per TPUCOS20. Gli *scaffold* rivestiti di collagene hanno inoltre mantenuto una significativa attività antiossidante, con valori di RSA compresi tra circa il 25 e il 30% (Figura 40).

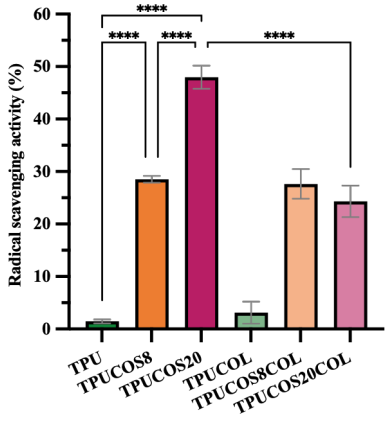


Figura 40. Confronto dell'attività antiossidante delle fibre di TPU puro, TPUCOS8, TPUCOS20 e delle fibre rivestite di collagene TPUCOL, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL. I valori sono espressi come media ± SD (n=3). Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0,05$. ****$p \leq 0,0001$.

4.6.10 Citotossicità *in vitro*

Come mostrato in Figura 41, tutti gli *scaffold* analizzati hanno mostrato valori di vitalità cellulare superiori alla soglia del 70%, considerata indicativa dell'assenza di citotossicità. Nel complesso, i valori sono risultati elevati per entrambe le concentrazioni di estratto, con variazioni contenute tra le diverse formulazioni. Sebbene siano state osservate alcune differenze statisticamente significative per TPUCOS20, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL ($p \leq 0,05$). Nel complesso, tutti gli *scaffold* hanno quindi mostrato una buona compatibilità cellulare nella linea cellulare e condizioni analizzate.

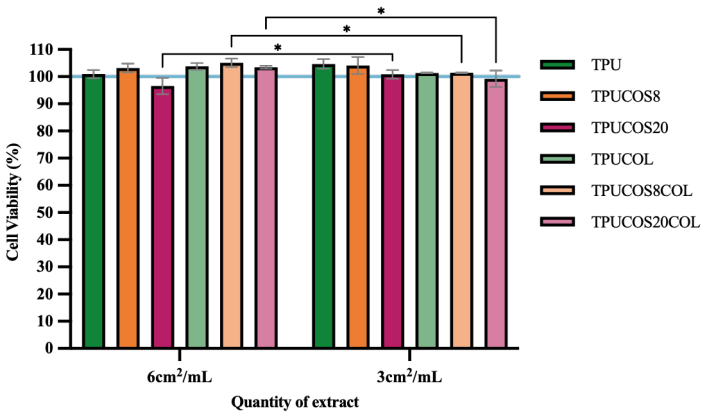


Figura 41. Confronto dell'attività antiossidante delle fibre di TPU puro, TPUCOS8, TPUCOS20 e delle fibre rivestite di collagene TPUCOL, TPUCOS8COL e TPUCOS20COL. I valori sono espressi come media ± SD (n=5). Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$.

4.7 Discussione

La caratterizzazione morfologica ha evidenziato che tutti gli *scaffold* presentano una struttura nanofibrosa omogenea e generalmene priva di difetti, mantenuta anche in seguito all'incorporazione dell'oligosaccaride del chitosano. Tuttavia, alle concentrazioni più elevate sono stati osservati alcuni aggregati, riconducibili alla parziale solubilizzazione del COS nella soluzione

polimerica. Tali fenomeni non sono stati ritenuti critici, poiché tutti i sistemi hanno mantenuto una fitta e interconnessa rete fibrosa, con fibre dal diametro medio nell'intervallo nanometrico e intorno ai 400 nm.

Gli *scaffold* più promettenti in termini di resistenza meccanica alla trazione, elasticità e valori del modulo di Young, adeguati all'applicazione prevista, nonché lo *scaffold* TPU tal quale, TPU con una concentrazione intermedia di COS (TPUCOS8) e con una concentrazione massima di COS (TPUCOS20), sono stati selezionati per il successivo rivestimento con collagene. Il rivestimento di collagene ha determinato un aumento del diametro medio delle fibre, particolarmente evidente per TPUCOS20COL, preservando comunque la morfologia nanofibrosa degli *scaffold* e le proprietà meccaniche anche dopo idratazione.

Inoltre, l'aumento del contenuto di COS ha favorito significativamente l'adsorbimento del collagene sulla superficie degli scaffold: rispetto a TPUCOL, la quantità di collagene adsorbito è risultata circa 3,9 volte maggiore per TPUCOS8COL e 9,6 volte maggiore per TPUCOS20COL. Tale comportamento potrebbe essere associato alla presenza dei gruppi funzionali del COS, in particolare amminici e ossidrilici, che possono favorire l'interazione con il collagene e contribuire al maggiore adsorbimento osservato.

La presenza del collagene sulla superficie è risultata inoltre coerente con le variazioni osservate mediante FT-IR, che hanno evidenziato modifiche nelle bande associate ai gruppi O–H/N–H e alle vibrazioni ammidiche, senza evidenziare alterazioni sostanziali delle caratteristiche chimiche delle matrici TPU/COS.

Anche la caratterizzazione mediante AFM ha evidenziato modifiche della superficie in seguito all'incorporazione del COS e al successivo rivestimento. In particolare, l'introduzione del COS ha modificato la topografia superficiale senza mostrare una relazione direttamente dipendente dalla sua concentrazione: alle basse concentrazioni è stata osservata una riduzione della rugosità, mentre alle concentrazioni più elevate i valori sono nuovamente aumentati, coerentemente con quanto osservato mediante SEM. Il rivestimento con collagene ha determinato un ulteriore incremento della rugosità superficiale,

particolarmente evidente per TPUCOS20COL, che ha mostrato i valori più elevati di Sa e Sq e le maggiori variazioni di altezza. Tale risultato è coerente con il maggiore quantitativo di collagene adsorbito, suggerendo che una maggiore deposizione del rivestimento possa contribuire alla maggiore irregolarità della superficie.

La risposta viscoelastica degli *scaffold* è influenzata principalmente dalla frequenza di sollecitazione: sia E' sia G' hanno infatti mostrato una tendenza all'aumento con la frequenza, mentre la presenza di COS non ha determinato un andamento sistematico dei moduli in funzione della sua concentrazione. I valori di E' e G' delle formulazioni contenenti COS sono risultati generalmente comparabili o superiori rispetto al TPU, ma le differenze tra le composizioni non sono risultate statisticamente significative. Anche gli *scaffold* rivestiti di collagene hanno mantenuto un comportamento analogo. I valori di tan δ, inferiori all'unità in tutte le condizioni analizzate, indicano infine una predominanza della componente elastica rispetto a quella viscosa.

Le caratteristiche superficiali degli *scaffold* si riflettono anche nella loro interazione con il contesto biologico. L'introduzione del COS ha infatti favorito l'interazione iniziale con l'ambiente acquoso, determinando una riduzione dell'angolo di contatto rispetto al TPU puro, in accordo con la maggiore idrofilicità conferita dall'oligosaccaride. Il rivestimento di collagene ha invece determinato una maggiore stabilità dell'angolo di contatto nel tempo, suggerendo un effetto del rivestimento sulla stabilità dell'interfaccia dello *scaffold* con l'ambiente biologico.

La maggiore idrofilicità associata alla presenza di COS è risultata coerente anche con il comportamento osservato durante l'incubazione. La perdita di peso è infatti rimasta contenuta negli *scaffold* con basse concentrazioni di COS, mentre è progressivamente aumentata all'aumentare del contenuto dell'oligosaccaride. Tale comportamento può essere ricondotto alla maggiore idratazione dello *scaffold* e al conseguente rilascio della componente più idrofila nel mezzo acquoso. Nei sistemi rivestiti di collagene è stata osservata una minore perdita di peso, dovuta alla natura più idrofobica del collagene, in grado di limitare

l'interazione dello *scaffold* con il mezzo acquoso e, di conseguenza, il rilascio della componente più idrofila.
L'incorporazione di COS ha determinato un progressivo incremento dell'attività antiossidante degli *scaffold*. Anche dopo il rivestimento di collagene, gli *scaffold* hanno mantenuto una significativa attività antiossidante, indicando che il rivestimento non ne compromette la funzionalità.
Infine, gli *scaffold* sviluppati non hanno mostrato effetti citotossici rilevanti, presentando in tutte le formulazioni e condizioni analizzate una buona vitalità cellulare, superiore al 70%. Nel complesso, questi risultati evidenziano quindi una buona compatibilità cellulare dei sistemi sviluppati, a supporto del loro potenziale impiego nella rigenerazione del tessuto cartilagineo.

4.8 Conclusioni e prospettive future

Il presente lavoro ha permesso di sviluppare *scaffold* nanofibrosi a base di TPU e COS, successivamente rivestiti di collagene, con l'obiettivo di combinare le proprietà strutturali e meccaniche del TPU con le caratteristiche biologiche funzionali del COS e del collagene. Nel complesso, gli *scaffold* sviluppati hanno mostrato una struttura nanofibrosa stabile, adeguate proprietà meccaniche e una buona compatibilità cellulare. L'introduzione del COS ha inoltre conferito agli *scaffold* una maggiore bagnabilità e proprietà antiossidanti crescenti con la sua concentrazione, mentre il rivestimento di collagene ha permesso di integrare una componente biologica chiave del tessuto cartilagineo, mantenendo al contempo le principali caratteristiche del sistema.
I risultati ottenuti indicano pertanto che la combinazione di TPU, COS e collagene rappresenta un approccio promettente per ulteriori studi volti a valutarne il potenziale nell'ambito della rigenerazione della cartilagine articolare.
Sarà innanzitutto importante approfondire la caratterizzazione biologica dei sistemi mediante studi *in vitro* con cellule staminali mesenchimali e condrociti, valutandone adesione, proliferazione e differenziamento condrogenico. Particolare interesse sarà rivolto alla valutazione della capacità degli *scaffold* di favorire la produzione di matrice extracellulare cartilaginea.

Sarà inoltre approfondito il potenziale antinfiammatorio conferito dal COS, valutando la risposta cellulare in condizioni rappresentative del microambiente infiammatorio associato alle lesioni articolari.

Bibliografia

[1] J. W. Alford and B. J. Cole, “Cartilage restoration, part 1: Basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options,” *American Journal of Sports Medicine*, vol. 33, no. 2, pp. 295–306, Feb. 2005, doi: 10.1177/0363546504273510/FORMAT/EPUB.

[2] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, and S. A. Rodeo, “The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function,” *Sports Health*, vol. 1, no. 6, pp. 461–468, Nov. 2009, doi: 10.1177/1941738109350438/FORMAT/EPUB.

[3] C. R. Maria Teresa Conconi, *Principi di anatomia microscopica con cenni di istologia e anatomia macroscopica*. 2018.

[4] K. E. Kuettner and A. A. Cole, “Review Cartilage degeneration in different human joints 1,2”, doi: 10.1016/j.joca.2004.11.006.

[5] S. S. Kuppa *et al.*, “ECM-Derived Electrospun and Electrospun-Hybrid Scaffolds for Cartilage Regeneration: From Matrix Mimicry to Clinical Translation,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 12, no. 4, pp. 2017–2044, Apr. 2026, doi: 10.1021/ACSBIOMATERIALS.5C02109/ASSET/IMAGES/LARGE/AB5C02109_0009.JPEG.

[6] C. Yang *et al.*, “Tissue engineering strategies hold promise for the repair of articular cartilage injury,” *BioMedical Engineering OnLine 2024 23:1*, vol. 23, no. 1, pp. 92-, Sep. 2024, doi: 10.1186/S12938-024-01260-W.

[7] R. B. T. J. L. N. Frederic H. Martini, *Anatomia Umana* . 2019.

[8] X. Chen, C. M. Macica, A. Nasiri, and A. E. Broadus, “Regulation of articular chondrocyte proliferation and differentiation by indian hedgehog and parathyroid hormone-related protein in mice,” *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 12, pp. 3788–3797, Dec. 2008, doi: 10.1002/ART.23985.

[9] S. Lau-Yuen Woo and J. Addision Buckwalter, “Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues,” *Journal of Orthopaedic Research*, p. 6907, doi: 10.1002/jor.1100060615.

[10] W. M. Lai, J. S. Hou, and V. C. Mow, “A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 113, no. 3, pp. 245–258, 1991, doi: 10.1115/1.2894880.

[11] J. Li, H. Zhang, Y. Han, Y. Hu, Z. Geng, and J. Su, “Targeted and responsive biomaterials in osteoarthritis,” *Theranostics*, vol. 13, no. 3, pp. 931–954, 2023, doi: 10.7150/THNO.78639.

[12] T. Aigner and L. Mckenna, “Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage,” *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, vol. 59, pp. 5–18, 2002.

[13] B. Zylinska, A. Sobczynska-Rak, U. Lisiecka, E. Stodolak-Zych, L. Jarosz, and T. Szponder, “Structure and Pathologies of Articular Cartilage,” *In Vivo (Brooklyn).*, vol. 35, no. 3, pp. 1355–1363, May 2021, doi: 10.21873/INVIVO.12388.

[14] C. Slattery and C. Y. Kweon, “Classifications in Brief: Outerbridge Classification of Chondral Lesions,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 476, no. 10, pp. 2101–2104, Oct. 2018, doi: 10.1007/S11999.0000000000000255.

[15] D. Umlauf, S. Frank, T. Pap, and J. Bertrand, “Cartilage biology, pathology, and repair”, doi: 10.1007/s00018-010-0498-0.

[16] J. A. Buckwalter, “Articular cartilage: Injuries and potential for healing,” *Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy*, vol. 28, no. 4, pp. 192–202, 1998, doi: 10.2519/JOSPT.1998.28.4.192.

[17] D. Correa and S. A. Lietman, “Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 67–77, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2016.07.013.

[18] D. A. Grande, J. A. Schwartz, E. Brandel, N. O. Chahine, and N. Sgaglione, “Articular Cartilage Repair: Where We Have Been, Where We Are Now, and Where We Are Headed,” *Cartilage*, vol. 4, no. 4, pp. 281–285, Oct. 2013, doi: 10.1177/1947603513494402.

[19] M. Falah, G. Nierenberg, M. Soudry, M. Hayden, and G. Volpin, “Treatment of articular cartilage lesions of the knee,” *Int. Orthop.*, vol. 34, no. 5, pp. 621–630, Jun. 2010, doi: 10.1007/S00264-010-0959-Y.

[20] N. A. Sgaglione, A. Miniaci, S. D. Gillogly, and T. R. Carter, “Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee,” *Arthroscopy*, vol. 18, no. 2 SUPPL. 1, pp. 9–32, 2002, doi: 10.1053/JARS.2002.31783.

[21] M. B. Eslaminejad and S. Hosseini, “Cartilage: From Biology to Biofabrication,” *Cartilage: From Biology to Biofabrication*, pp. 1–527, Jan. 2023, doi: 10.1007/978-981-99-2452-3/SAVE-RESEARCH.

[22] H. Madry, U. W. Grün, and G. Knutsen, “Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options,” *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 108, no. 40, pp. 669–677, Oct. 2011, doi: 10.3238/ARZTEBL.2011.0669.

[23] H. Kutaish, A. Klopfenstein, S. Nasif, O. Adorisio, P. M. Tscholl, and S. Fucentese, “Current trends in the treatment of focal cartilage lesions: a comprehensive review,” 2025, doi: 10.1530/EOR-2024-0083.

[24] Y. Liu, K. M. Shah, and J. Luo, “Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, Dec. 2021, doi: 10.3389/FBIOE.2021.770655/FULL.

[25] E. Bianchi *et al.*, “Innovative Strategies in Tendon Tissue Engineering,” *Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 89*, vol. 13, no. 1, p. 89, Jan. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13010089.

[26] J. Liang *et al.*, “Biomaterial-based scaffolds in promotion of cartilage regeneration: Recent advances and emerging applications,” *J. Orthop. Translat.*, vol. 41, pp. 54–62, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.JOT.2023.08.006.

[27] V. Irawan, T. C. Sung, A. Higuchi, and T. Ikoma, “Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 15, no. 6, pp. 673–697, Dec. 2018, doi: 10.1007/S13770-018-0135-9.

[28] V. Rai, M. F. Dilisio, N. E. Dietz, and D. K. Agrawal, “Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 105, no. 8, pp. 2343–2354, Aug. 2017, doi: 10.1002/JBM.A.36087.

[29] L. Huang *et al.*, “Biomimetic Scaffolds for Tendon Tissue Regeneration,” *Biomimetics*, vol. 8, no. 2, p. 246, Jun. 2023, doi: 10.3390/BIOMIMETICS8020246.

[30] Z. Cao, C. Dou, and S. Dong, “Scaffolding Biomaterials for Cartilage Regeneration,” *J. Nanomater.*, vol. 2014, no. 1, p. 489128, Jan. 2014, doi: 10.1155/2014/489128.

[31] M. Wasyłeczko, W. Sikorska, and A. Chwojnowski, “Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering,” *Membranes 2020, Vol. 10, Page 348*, vol. 10, no. 11, p. 348, Nov. 2020, doi: 10.3390/MEMBRANES10110348.

[32] F. Mukasheva, L. Adilova, A. Dyussenbinov, B. Yernaimanova, M. Abilev, and D. Akilbekova, “Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 12, 2024, doi: 10.3389/FBIOE.2024.1444986.

[33] Y. Zhang *et al.*, “Polymer Fiber Scaffolds for Bone and Cartilage Tissue Engineering,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 29, no. 36, p. 1903279, Sep. 2019, doi: 10.1002/ADFM.201903279.

[34] L. L. Fernandes, C. X. Resende, D. S. Tavares, G. A. Soares, L. O. Castro, and J. M. Granjeiro, “Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering,” *Polímeros*, vol. 21, no. 1, pp. 1–6, 2011, doi: 10.1590/S0104-14282011005000008.

[35] H. Y. Mi, X. Jing, B. N. Napiwocki, B. S. Hagerty, G. Chen, and L. S. Turng, “Biocompatible, degradable thermoplastic polyurethane based on polycaprolactone-block-polytetrahydrofuran-block-polycaprolactone copolymers for soft tissue engineering,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 22, pp. 4137–4151, Jun. 2017, doi: 10.1039/C7TB00419B.

[36] E. Bianchi, B. Vigani, C. Viseras, F. Ferrari, S. Rossi, and G. Sandri, “Inorganic Nanomaterials in Tissue Engineering,” *Pharmaceutics 2022, Vol. 14, Page 1127*, vol. 14, no. 6, p. 1127, May 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14061127.

[37] D. S. Kohane and R. Langer, “Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering,” *Pediatric Research 2008 63:5*, vol. 63, no. 5, pp. 487–491, May 2008, doi: 10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7.

[38] J. Raghunath, J. Rollo, K. M. Sales, P. E. Butler, and A. M. Seifalian, “Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 46, no. 2, pp. 73–84, Feb. 2007, doi: 10.1042/BA20060134.

[39] Y. He *et al.*, “A 3D-Printed PLCL Scaffold Coated with Collagen Type I and Its Biocompatibility,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, no. 1, p. 5147156, Jan. 2018, doi: 10.1155/2018/5147156.

[40] Y. B. Truong, V. Glattauer, K. L. Briggs, S. Zappe, and J. A. M. Ramshaw, “Collagen-based layer-by-layer coating on electrospun polymer scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 36, pp. 9198–9204, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.09.012.

[41] M. Bacakova *et al.*, “Protein nanocoatings on synthetic polymeric nanofibrous membranes designed as carriers for skin cells,” *Int. J.*

Nanomedicine, vol. 12, pp. 1143–1160, Feb. 2017, doi: 10.2147/IJN.S121299.

[42] X. Hu, Z. Wu, Z. Zhang, H. Yao, and D. A. Wang, "Type II collagen scaffolds for tissue engineering," *Commun. Mater.*, vol. 5, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/S43246-024-00598-X.

[43] F. Comblain, G. Rocasalbas, S. Gauthier, and Y. Henrotin, "Chitosan: A promising polymer for cartilage repair and viscosupplementation," *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 28, no. s1, pp. S209–S215, 2017, doi: 10.3233/BME-171643.

[44] M. Kołodziejska, K. Jankowska, M. Klak, and M. Wszoła, "Chitosan as an underrated polymer in modern tissue engineering," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/NANO11113019.

[45] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, "Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, no. 1, p. 821279, Jan. 2015, doi: 10.1155/2015/821279.

[46] F. Croisier and C. Jérôme, "Chitosan-based biomaterials for tissue engineering," *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 4, pp. 780–792, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2012.12.009.

[47] S. Islam, M. A. R. Bhuiyan, and M. N. Islam, "Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering," *Journal of Polymers and the Environment 2016 25:3*, vol. 25, no. 3, pp. 854–866, Oct. 2016, doi: 10.1007/S10924-016-0865-5.

[48] I. Y. Kim *et al.*, "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–21, Jan. 2008, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2007.07.009.

[49] B. Naureen, A. S. M. A. Haseeb, W. J. Basirun, and F. Muhamad, "Recent advances in tissue engineering scaffolds based on polyurethane and

modified polyurethane," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 118, p. 111228, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.MSEC.2020.111228.

[50] J. P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche, and R. S. Labow, "Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials," *Biomaterials*, vol. 26, no. 35, pp. 7457–7470, Dec. 2005, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.05.079.

[51] G. peng Dang *et al.*, "Multifunctional polyurethane materials in regenerative medicine and tissue engineering," *Cell Rep. Phys. Sci.*, vol. 5, no. 7, Jul. 2024, doi: 10.1016/J.XCRP.2024.102053/ASSET/9FDC9A81-026A-4D61-BC44-C45515188682/MAIN.ASSETS/GR7.JPG.

[52] S. Singh *et al.*, "Recent Advancements in Polyurethane-based Tissue Engineering," *Cite This: ACS Appl. Bio Mater*, vol. 6, p. 348, 2023, doi: 10.1021/acsabm.2c00788.

[53] "Bovine Collagen, Type I Polymeric (Insoluble)."

[54] C. Tangsadthakun, S. Kanokpanont, N. Sanchavanakit, T. Banaprasert, and S. Damrongsakkul, "Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering," *Journal of Metals, Materials and Minerals*, vol. 16, no. 1, pp. 37–44, Apr. 2017, Accessed: Jul. 13, 2026. [Online]. Available: https://jmmm.material.chula.ac.th/index.php/jmmm/article/view/250

[55] S. S. Latthe, C. Terashima, K. Nakata, and A. Fujishima, "Superhydrophobic Surfaces Developed by Mimicking Hierarchical Surface Morphology of Lotus Leaf," *Molecules 2014, Vol. 19, Pages 4256-4283*, vol. 19, no. 4, pp. 4256–4283, Apr. 2014, doi: 10.3390/MOLECULES19044256.

[56] E. Kaniuk *et al.*, "Correlation between porosity and physicochemical and biological properties of electrospinning PLA/PVA membranes for skin regeneration," *Biomaterials Advances*, vol. 152, p. 213506, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.BIOADV.2023.213506.